UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1947-1948. — N° 86

L'HYALURONIDASE

SON UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DE CERTAINES FORMES DE STÉRILITÉ

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le 31 mai 1948

PAR

Georges-Pierre-Marie THÉBAULT

Élève de l'École principale du Service de Santé de la Marine et des Colonies.

Né à AVRANCHES (Manche), le 31 mars 1922.

Examinateurs de la Thèse	MM. RIVIERE, professeur	*Président.*
	DARGET, professeur	*Juges.*
	MAGENDIE, agrégé	
	MAYER, agrégé	

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly, 6

1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547308_0010

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1947-1948. — N° 86

L'HYALURONIDASE

SON UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DE CERTAINES FORMES DE STÉRILITÉ

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le 31 mai 1948

PAR

Georges-Pierre-Marie THÉBAULT

Élève de l'École principale du Service de Santé de la Marine et des Colonies.

Né à AVRANCHES (Manche), le 31 mars 1922.

Examinateurs de la Thèse

MM. RIVIERE, professeur ..... *Président.*
DARGET, professeur ..... *Juges.*
MAGENDIE, agrégé ..... *Juges.*
MAYER, agrégé ..... *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly, 6

1954

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. DUPÉRIÉ.

ASSESSEUR : M. CHELLE.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. DENIGÈS, H. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PERY, LABAT.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.
id.	CREYX.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurg. et gynécol.	CHARRIER.	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. inf. et orthop.	LOUBAT.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.	Clin. des maladies infectieuses	DAMADE.
Anatomie pathol. et microsc. clin.	DE GRAILLY.	Chimie biologique et médicale	MACHEBOEUF.
Anatomie	VILLEMIN.	Physique méd. et pharmaceutique	PIFFAULT.
Anatomie générale et histologie.	G. DUBREUIL.	Méd. col. et clin. mal. exotiques.	BONNIN.
Hygiène	PIÉCHAUD.	Clin. malad. cutanées et syphilit.	JOULIA.
Médecine légale et déontologie.	DERVILLÉE.	Clin. des mal. des voies urinaires.	DARGET.
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	REBOUL.	Clin. mal. nerveuses et mentales.	DELMAS-MARSALET
Chimie	CHELLE.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Toxicologie et hygiène appliquée.	CASTAGNOU.
Pharmacie	VITTE.	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.
Physiologie	FABRE.	Clin. méd. des mal. des enfants.	FONTAN.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. PERRENS (Maladies mentales) — DUFOUR (Anatomie); GIRARD (Histoire naturelle pharmaceutique); — MESNARD (Pharmacie).

MAITRE DE CONFÉRENCES

M. BLANQUET (Physique pharmaceutique).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	N...	Obstétrique	N...
Physiologie	N...	id.	MAHON.
Médecine générale	BROUSTET.	Ophtalmologie	BESSIÈRE.
id.	SARIC.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	DUBARRY.	Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT.
id.	F.-J. TRAISSAC	Histologie	MAYER.
id.	BERGOUIGNAN.	Physique médicale	N...
Pédiatrie et puériculture	VERGER.	Chimie gén. pharm. et toxicol.	N...
Chirurgie générale	MASSÉ.	Histoire natur. méd. et parasitol.	N...
id.	MAGENDIE.	Pédiatrie et Puériculture	VERGER.
id.	POUYANNE.	Méd. légale et méd. du travail.	L'ÉPÉE.
id.	LAUMONIER.	Electroradiologie	LACHAPÈLE.
id.	CHAVANNAZ.	Odonto-stomatologie	MARONNEAUD.
Chimie biologique	TAYEAU.		

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	MASSÉ.	Cryptogamie	GIRARD.
Accouchements	N...	Pharmacie galénique	MESNARD.
Puériculture	PERY.	Bactériologie	MOUREAU.
Urologie	N...	Physiologie	Mlle ROUGIER.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Chimie biologique	N...
Ophtalmologie	N...	Parasitologie et biologie appliqu.	PAUTRIZEL.
Anatomie	RIGAUD.	Pathologie chirurgicale	LAUMONIER.
Chimie minérale	N...	Electroradiologie	CAILLON.
Botanique	GIRARD.		

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA FEMME

A MON FILS

A LA MEMOIRE DE MON ONCLE

LE DOCTEUR LOUIS THÉBAULT

Croix de guerre,
Médaille d'Or des épidémies,
Victime du Devoir professionnel.

A LA MEMOIRE DE MON ONCLE

GEORGES MASSON

Etudiant en Médecine

MORT POUR LA FRANCE (1914).

A MA MERE — A MON PERE

Bien faible témoignage de mon affection et de ma reconnaissance.

A MA GRAND-MERE

A TOUS LES MIENS

A Mon beau-frère Henri LABORIT

Médecin de 1re classe de la Marine,
Ancien Interne des Hôpitaux de Bordeaux.

AUX DOCTEURS

Guy CLEMENT et Alain BERSIHAND

En souvenir de nos années d'études et de S. T. O.

A TOUS MES CAMARADES DE PROMOTION

MEIS ET AMICIS

A Monsieur le Médecin Général GALIACY

Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé de la Marine
et des Troupes coloniales,
Commandeur de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Médaille de la Résistance.

A Monsieur le Médecin en chef de 2e classe SIMON

Sous-Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé de la Marine
et des Troupes coloniales,
Médecin des Hôpitaux maritimes,
Officier de la Légion d'honneur,
Officier d'Académie,
Médaille d'Argent de l'Education physique.

Au Docteur Irène BERNARD

Licenciée ès Sciences,
Assistante à la Clinique gynécologique de l'Hôpital A.-Boursier.

Qui nous a fourni le sujet de cette thèse et nous a encouragé dans l'élaboration de ce travail.

A Monsieur le Professeur agrégé MAYER

Dont les précieux conseils nous ont été d'un grand secours. Qu'il en soit remercié.

A NOS JUGES

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Marc RIVIÈRE

Professeur de Clinique obstétricale,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre,
Officier de l'Instruction publique.

Une fois déjà, nous avons eu recours à votre bonté.

Aujourd'hui, vous avez bien voulu vous intéresser à ce modeste travail et nous faire l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Recevez ici l'expression de notre profonde gratitude.

L'HYALURONIDASE

SON UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DE CERTAINES FORMES DE STÉRILITÉ

AVANT-PROPOS

Chaque jour, l'importance des diastases se fait plus évidente dans les différents domaines de la biologie.

L'hyaluronidase, très étudiée en Angleterre et en Amérique, où elle a vu le jour récemment, est encore peu connue en France du fait de l'isolement de notre pays pendant la guerre.

Nous nous proposions de rassembler, dans la mesure de nos moyens, le maximum d'éléments parus sur ce sujet jusqu'à ce jour. Mais cette entreprise s'est montrée très vaste, l'hyaluronidase jouant un rôle important dans de nombreux processus biologiques.

Aussi avons nous dû limiter notre étude à un chapitre particulier. Nous avons choisi celui qui a trait au rôle de l'hyaluronidase dans la fécondation, et par conséquent dans certaines formes de stérilités dues précisément à son absence.

Nous diviserons notre travail de la manière suivante :

— Nous donnerons d'abord des généralités sur cette diastase, en étudiant ses rapports avec les facteurs de diffusion dont elle fait partie. Nous verrons son origine, son mode

d'action, sa préparation, ses dosages, et le rôle qu'elle joue dans divers processus biologiques.

— Puis nous passerons à l'étude de l'un de ces processus : la fécondation. Après avoir montré d'où vient l'hyaluronidase contenue dans le sperme, et comment on peut la doser d'une manière pratique dans ce milieu, nous ferons un rappel du mécanisme de la fécondation afin de nous mieux rendre compte du rôle qu'elle joue et des moments où elle intervient.

— Enfin, dans une dernière partie, nous essaierons de définir les stérilités que son absence crée, nous montrerons comment les traiter, et nous rapporterons les très encourageants résultats obtenus jusqu'à ce jour.

Qu'il nous soit permis de remercier ici le Professeur I. Schwenk, de la Schering Corporation (N.J.), et la U.S. Information Library, qui ont bien voulu mettre à notre disposition un certain nombre de documents sans lesquels il nous eût été très difficile de mener à bien ce travail.

PREMIÈRE PARTIE

FACTEURS DE DIFFUSION ET HYALURONIDASE

CHAPITRE PREMIER

LES FACTEURS DE DIFFUSION

L'observation fondamentale qui amena la découverte des « facteurs de diffusion » date de 1928. Duran Reynals observa [13] que la lésion cutanée produite chez le lapin par le virus vaccinal était considérablement aggravée par l'extrait de testicule de mammifère, et ceci que l'on ajoute l'extrait à la vaccine ou que l'on fasse une injection de l'extrait plusieurs jours auparavant. Il fut aussi trouvé [71] que lorsque les inoculations étaient faites dans le testicule lui-même, l'infection vaccinale se développait plus précocement. Cette propriété diffusante fut reconnue plus tard, et indépendamment des travaux précédents, par Mac Clean en Angleterre [42-43-44].

Des observations complémentaires montrèrent que ces facteurs agissaient non sur le virus lui-même, mais sur le tissu hébergeant le virus. Celui-ci, en effet, une fois récupéré, ne voyait pas ses propriétés changées. Duran Reynals montra [15-28] que si l'on injectait sous la peau d'un lapin préalablement rasée un mélange d'extrait testiculaire et d'une solution d'encre de Chine, ou d'un colorant, ce produit diffusait sous la peau de l'animal « comme l'encre sur un buvard ». Si l'on fait, chez le même animal, une injection témoin avec

la seule solution d'encre de Chine ou de colorant, celle-ci reste localisée, et il est impossible de la faire diffuser, même par pression. On montra également la diffusion, sous l'action de l'extrait testiculaire, d'éléments variés tels que le virus de la rage, la toxine diphtérique [3], l'hémoglobine [1], la méthémoglobine. Ces facteurs de diffusion furent appelés facteurs de Duran Reynals, ou, plus simplement, facteurs « R ».

Mode d'action des facteurs de diffusion.

Dès 1935, il fut suggéré par Favilli que le facteur « R » agissait en désintégrant le matériel inter-fibrillaire des tissus [19]. Mais ce n'est que plus tard, en 1939, que Chain et Duthie [4] remarquèrent que des préparations purifiées de facteurs de diffusion d'origine testiculaire avaient une activité mucolytique remarquable. La viscosité du liquide synovial tombe très rapidement lorsque celui-ci est mélangé avec le dixième de son volume en extrait.

Il fut démontré [2] l'existence sous la peau d'une substance interfibrillaire équivalente à la « mucine », dont le facteur de Duran-Reynals diminuait la viscosité, rendant ainsi possible la diffusion des produits injectés en même temps que lui.

Favilli [20], Mac Clean et Hale [47] confirmèrent l'hypothèse de Chain et Duthie et montrèrent que l'effet diffusant était vraisemblablement dû à une « mucinase ».

Les facteurs de diffusion ayant cette origine « mucolytique » forment le groupe « A » des facteurs « R ». Ils ont généralement une origine naturelle [9]. Ils s'opposent à ceux du groupe « B », que nous ne ferons que signaler pour être complet. En effet, ces facteurs, tels que l'acide ascorbique [48], la glycérine [26], la triacétine [26], l'uréthane, etc., diffèrent des premiers en de nombreux points; en particulier ils ne sont pas « mucolytiques » et à ce titre ne sauraient nous intéresser ici.

CHAPITRE II

L'HYALURONIDASE

1° Définitions.

Meyer et Palmer [57-58] isolèrent à partir de l'humeur vitrée un constituant de haute viscosité, de poids moléculaire élevé, qui donna à l'analyse : de l'acide uronique, un sucre aminé et un pentose. Ils dénommèrent ce corps *acide hyaluronique*.

D'autre part, en étudiant l'action des facteurs de diffusion, on remarqua qu'ils agissaient sur la viscosité d'extraits d'yeux d'animaux. Les auteurs décidèrent alors d'attribuer le nom de « hyaluronidase » à toute diastase capable d'effectuer l'hydrolyse du polysaccharide qu'est l'acide hyaluronique [56].

Cet acide prit alors une importance d'autant plus grande qu'il devint un test spécifique de cette diastase dont il est à la base de toutes les méthodes de dosage. Il a été isolé à partir de nombreuses substances de l'organisme et de nombreux tissus [8-59]. C'est ainsi qu'on le trouve dans les poumons, les tissus tumoraux, le cordon ombilical, l'humeur vitrée, etc.

Une mise au point est nécessaire au sujet de ces deux composés. En effet, lorsqu'on les étudia, on se rendit compte que l'acide hyaluronique présentait des caractères de viscosité assez particuliers permettant de le rapprocher des mucines, des mucoïdes, des mucus. Et c'est à ce titre que certains facteurs de diffusion purent être étiquetés « muci-

naces », et que l'on put parler de l'activité « mucolytique » de ces facteurs. Or il n'existe aucun point commun entre l'acide hyaluronique et les mucines en dehors de la viscosité. A l'encontre de celles-ci, l'acide hyaluronique se trouve exclusivement dans des tissus d'origine mésodermique. De plus, ces substances contiennent des protéines, tandis que l'acide hyaluronique n'en contient jamais. Il existe donc, actuellement encore, une terminologie défectueuse qui a égaré certains chercheurs; c'est ainsi que l'on a étudié l'action de l'hyaluronidase sur les mucus gastrique et salivaire. On a même voulu rechercher l'action de cet enzyme sur le mucus produit par le col de l'utérus; or il est certain à l'heure actuelle que cette diastase n'a aucune action sur ces différents mucus, à tel point que l'on a pu affirmer : toute substance agissant sur le mucus cervical n'est pas de l'hyaluronidase [79]. Il semble donc nécessaire, maintenant que l'on connaît la composition de l'acide hyaluronique, de s'en tenir à la définition précise donnée par Meyer, et que nous avons rappelée plus haut, et il y aura intérêt à ne plus utiliser les termes de « mucinase », « enzyme mucolytique », « mésomucinase », pour utiliser exclusivement celui de « hyaluronidase » lorsqu'on parlera des facteurs capables d'effectuer l'hydrolyse de l'acide hyaluronique.

2° Hyaluronidase et facteurs de diffusion.

Etant donné les nombreux points communs existant entre facteurs de diffusion des groupes A et hyaluronidase, de nombeuses expériences furent faites pour montrer l'identité de ces deux éléments.

C'est ainsi que Chain et Duthie confirment par des expériences plus poussées l'hypothèse précédemment émise par eux [4], suivant laquelle facteur de Duran Reynals et hyaluronidase sont identiques. Leur conclusion [5] est que l'hyaluronidase hydrolyse le polyholoside visqueux présent dans le liquide synovial et l'humeur vitrée, réduisant rapidement sa viscosité à celle de l'eau, favorisant ainsi la diffusion.

D'autre part, Mac Clean et Hale montrent que s'il est injustifiable à présent de doser les facteurs de diffusion en utilisant la mesure de la viscosité, cela ne veut pas dire que les deux phénomènes soient dus à des agents différents [48].

Enfin, Favilli, se basant sur l'identité des corps obtenus lors de l'hydrolyse de l'acide hyaluronique par l'hyaluronidase et par les facteurs de diffusion de différentes sources, conclut à l'identité de ces deux facteurs [20].

Mais si, pour ces auteurs, la preuve de l'unité est faite, d'autres se refusent à l'admettre.

C'est ainsi que Madinaveitia, Todd, Bacharrach et Chance (1940) n'obtiennent pas satisfaction dans la comparaison entre facteurs de diffusion et réduction de viscosité.

Hobby, Meyer, Dawson et Chaffée montrent que si l'hyaluronidase joue un rôle important dans la diffusion, le phénomène est plus complexe et ne saurait être expliqué sur les simples bases d'une réaction chimique [26].

D'une manière générale, on ne peut pas ne pas remarquer un certain parallélisme entre l'action des facteurs de diffusion et celle de l'hyaluronidase. Ils sont en effet tous deux mucolytiques, diminuent la viscosité et libèrent des substances réductrices. Cependant, ce parallélisme qualitatif ne serait pas quantitatif; de plus, si l'on veut par exemple mesurer l'action diffusante de l'hyaluronidase, on se heurte à de grosses difficultés dans la précision des mesures de la diffusion, ce qui introduit une cause d'erreur importante pour la comparaison.

La question n'est pas encore définitivement tranchée à notre connaissance. Il faudra attendre des précisions chimiques pour ce faire. En effet, on ne sait pas encore si les extraits testiculaires contiennent un seul enzyme, ou bien une polysaccharase et une oligosaccharase. Dans ce dernier cas, l'augmentation des propriétés réductrices de la substance contenue dans les extraits testiculaires pourrait être une mesure de l'effet combiné des enzymes, tandis que la diminution de la viscosité serait une mesure de la seule polysaccha-

rase [30]. Cette explication pourrait se trouver confirmée par Hahn; celui-ci, étant arrivé à pousser assez loin le degré de purification de l'enzyme, ne se serait pas trouvé en présence d'une entité chimique [23].

3° Origine de l'hyaluronidase.

Ce sont, comme nous l'avons vu, les extraits testiculaires qui sont les plus riches en hyaluronidase. C'est d'ailleurs de cette source que l'on fabrique industriellement cette diastase. Elle y serait associée à l'épithélium germinal et se retrouve en quantité appréciable dans le sperme, où elle joue un rôle important au moment de la fécondation. Ce rôle, mis en évidence par Mac Clean et Rowlands [49], Fekete et Duran Reynals [21], sera étudié tout particulièrement dans un prochain chapitre.

Cependant on ne put en déceler aucune trace dans ces mêmes glandes chez le coq, le pigeon [72], le serpent, le lézard et le crapaud [21]. On put en obtenir à partir de certains microbes [14] staphylocoques [10], streptocoque hémolytique [52], pneumocoque [11-29], *clostridium welchii*, *clostridium butylicum* [41]. Par contre, le méningocoque, les bacilles tuberculeux, typhique, tétanique, ne présentent aucune action diffusante [33].

On la trouve en certaine quantité chez plusieurs espèces de serpents. Favilli a montré [20] que chez quelques-uns de ces animaux le venin a une action très nette sur des milieux riches en acide hyaluronique, et ce pour de très grandes dilutions (1/100.000 de venin sec); cet effet est détruit par le chauffage (30 minutes à 70°) ou quand on ajoute un anti-sérum spécifique. Mais on ne put en trouver dans le venin de crapaud.

On a pu la mettre en évidence chez certains insectes venimeux, où elle est associée également au venin : abeille, scorpion. Aucune trace ne put être décelée chez des insectes non venimeux [16].

Duran Reynals et Stewart [18], Boyland et Mac Clean [3], ont établi sa présence dans des tissus néoplasiques, et on a voulu voir une relation entre la concentration en enzyme et la malignité de la tumeur. On doit cependant dire que certaines tumeurs, très malignes, en contiennent peu.

Claude put montrer [7] qu'elle existait dans des extraits de sangsue. Des essais faits pour la séparer du facteur anticoagulant chez cet animal montrent que ces deux éléments ont sensiblement la même distribution, les extraits de tête isolée étant les plus actifs.

Chez l'homme, on trouve cette diastase dans différents organes, parmi lesquels on peut citer : le rein, la peau, le poumon, le cerveau, les tissus placentaires et embryonnaires [8-54-78].

4° Etude chimique de l'hyaluronidase.

Cette étude, complexe, ressort d'un domaine spécialisé. Aussi ne ferons-nous que rapporter, en leurs propres termes, les conclusions des savants qui se sont penchés sur ce problème [79].

« L'hyaluronidase se présente comme une protéine ou intimement associée à une protéine dont elle donne les réactions caractéristiques (Millon, xanthoprotéique, du biuret, de l'acide glyoxylique, diazoréaction). Elle contient du phosphore inorganique et des sulfures organiques. Elle est inactivée par la pepsine à pH 2, la trypsine à pH 8, par les rayons ultra-violets, par la chaleur (100° C pendant 5 minutes), mais pas par la carboxypolypeptidase à pH 8 ou par les rayons X. Elle est filtrable et non dialysable avec un poids moléculaire probablement inférieur à 10.000. Sa thermolabilité a été un point de discussion. Il a été soutenu que la coagulation des protéides associées et l'adsorption par elles de la partie active explique la perte d'activité par chauffage, tandis que le matériel plus purifié serait plus stable. On s'est demandé si même de grosses différences dans l'activité peuvent être détectées par les méthodes usuelles de mesure de la diffusion, tant sa

stabilité à la chaleur est incertaine. L'enzyme peut perdre ou ne pas perdre son activité en vieillissant; de telles variations ont été expliquées par des destructions bactériennes. Elle résiste à un pH2 et est apparemment plus thermostable en solution acide.

» L'hyaluronidase est une diastase typique, et comme telle on peut penser qu'elle est une protéine. » (1).

5° Mode d'action de l'hyaluronidase.

Elle agit sur l'acide hyaluronique par dépolymérisation puis hydrolyse des liaisons glucidiques et a pour résultat de libérer des quantités équi-moléculaires d'un sucre aminé identifié comme étant de l'N-acétyl-glucosamine et d'un acide uronique, probablement de l'acide glycuronique, ces deux éléments étant disposés en très longues chaînes.

Cependant il semble bien que l'action de l'enzyme soit plus complexe : pour Lythgoe et Madinaveitia [41], l'hyaluronidase est non *une diastase*, mais *un système enzymatique* dans lequel on pourrait distinguer :

— un composé réduisant la viscosité des polysaccharides visqueux, sans libérer aucune quantité appréciable de sucre réducteur;

— une glucosaminase qui n'attaquerait pas les polysaccharides visqueux, mais jouerait un rôle dans l'hydrolyse des polysaccharides en brisant des liaisons glucosaminiques;

— un troisième facteur possible : une uronidase qui hydrolyserait les liaisons uronidiques des polysaccharides.

Hahn serait arrivé à individualiser deux enzymes distincts [24] :

— une mucopolysaccharase (M. P.) qui hydrolyse le substrat et l'amène au stade d'acide aldobionique;

(1) Extrait de la Monographie qui nous a été très aimablement fournie par la Schering Corporation, Bloomfield, N. J. (p. 17).

— une mucooligosaccharase (M. O.) qui hydrolyserait les dissaccharides, et les amènerait au stade de monosaccharides.

Comme la M. P. libère de l'acétylglucosamine pendant l'hydrolyse, le groupe libre aldéhyde semble appartenir à la fraction hexosamine, et c'est pour cette raison qu'on a appelé la M. O. : « glycuronidase ».

Pour cet auteur, la β-glucosaminase qu'on trouve dans certains produits contenant de l'hyaluronidase, mais que l'on peut rencontrer aussi en dehors de cette diastase, aurait une action nettement distincte de celle de l'hyaluronidase et n'interviendrait pas dans l'hydrolyse de l'acide hyaluronique.

Humphrey a pu montrer que la réaction diastasique varie suivant l'origine de la diastase : c'est ainsi que les enzymes bactériens libéreraient davantage de substances réductrices tandis que les venins de serpent n'en libéreraient aucune; et cette constatation amène l'auteur à penser qu'il faut plus d'un enzyme pour obtenir une hydrolyse complète de l'hyaluronate de potassium [30].

Quoi qu'il en soit, on peut schématiser l'action de la diastase extraite de testicule de taureau de la manière suivante [51] :

Acide hyaluronique visqueux

Acide hyaluronique non visqueux

Acide glycuronique — N-acétylglucosamine

Glucosamine — Acide acétique

Produits d'oxydation — NH^3

6° Influence de certains facteurs sur l'activité de l'hyaluronidase.

Certaines précisions ont été apportées [54] sur les conditions dans lesquelles agit l'hyaluronidase. C'est ainsi que l'on a étudié :

— Le pH. Il semble avoir une grande importance sur la vitesse de réaction. Sa valeur optimum serait de 4,7. La

vitesse de réaction décroîtrait très rapidement au fur et à mesure que l'acidité augmente. Elle diminuerait moins rapidement et par degrés sur le versant alcalin. Il varierait suivant la source à partir de laquelle l'enzyme est extrait [55]. Les échantillons obtenus à partir de testicules de taureau semblent avoir un pH optimum double, l'un aux environs de 4,5, l'autre aux environs de 5,7. Certains auteurs ont vu dans ce fait un argument supplémentaire permettant la présence de deux enzymes différents. Les courbes de réaction en fonction du pH sont profondément modifiées non seulement par la concentration en sels, mais aussi par la nature des ions se trouvant dans le système tampon employé : c'est ainsi qu'avec une solution tampon M/6 l'activité serait plus grande à pH 4,6 qu'à pH 7, tandis que c'est l'inverse avec une solution M/60. Les ions Na +, K + et Ca + + seraient « activants », tandis que Cl —, I — et SO^4 — le seraient moins [48].

— La température agit aussi sur la vitesse de réaction. Celle-ci croît proportionnellement lorsque la température passe de 0° à 40°.

— La concentration du substrat ne semble pas influencer la vitesse de réaction [50]. Cependant certains auteurs ont montré que si le temps nécessaire pour diminuer de moitié la viscosité est constant, quelle que soit la concentration du substrat, le temps nécessaire pour que la réaction soit totale augmente proportionnellement avec cette concentration. Il apparaît ainsi que les méthodes de dosage basées sur ce principe sont sujettes à critique si l'on admet ces conclusions.

— L'action de certaines substances : on a pu montrer que si certaines substances comme la sulfanilamide et la sulfapyridine étaient sans action sur l'hydrolyse de l'acide hyaluronique par la diastase, par contre d'autres substances inhibent ce phénomène; on peut citer : l'héparine, la morphine, le salicylate, les pseudo-globulines du sérum de différents animaux (lapin, mouton, souris) [45]. L'acide ascorbique favoriserait l'hydrolyse.

7° Méthodes de préparation de l'hyaluronidase.

Ce sont des méthodes assez complexes. Nous en donnerons une en détail lorsque nous étudierons cette diastase dans le sperme. Il semble qu'actuellement ce soit l'hyaluronidase préparée industriellement qui présente le maximum de garanties pour l'expérimentation. C'est pourquoi cette question ne nous retiendra pas plus longtemps.

8° Méthodes de dosage de l'hyaluronidase.

Plusieurs méthodes ont été proposées. Nous ne pouvons les exposer toutes dans le détail de leur complexité. Elles sont d'ailleurs sujettes à des remaniements constants qui tendent à les simplifier et à les rendre plus précises. Nous ne donnerons ici que les principes sur lesquels elles reposent, nous réservant le soin d'en exposer une en détail au chapitre « hyaluronidase et sperme ».

A. — Dosage biologique.

L'hyaluronidase étant un facteur de diffusion, on peut apprécier son activité en mesurant l'augmentation de la diffusion qu'elle produit [17].

B. — Dosage viscosimétrique (viscosimetric assay).

Il consiste à mesurer la diminution de viscosité d'une solution d'acide hyaluronique sous l'action de la diastase

Madinaveitia et Quibbel ont en effet montré [50] que la diminution de viscosité de la « mucine » sous l'action d'une mucinase est un processus catalytique, et que la disparition du matériel visqueux pourrait obéir aux lois des réactions unimoléculaires. Il a été confirmé expérimentalement, en utilisant un extrait testiculaire, que la constance de la réaction est indépendante de la concentration du substrat et que le temps nécessaire pour réduire de moitié la viscosité spécifique de la « substance mucinique » est inversement proportionnel à la quantité d'enzyme étudiée.

Mac Clean et Hale, se basant sur ces travaux, définissent la V. R. U. (Viscosity Reducting Unity), ou unité de réduction de la viscosité) comme étant la concentration en enzyme nécessaire pour faire tomber en vingt minutes la viscosité de sa valeur primitive à une valeur se situant à mi-chemin entre la valeur de la viscosité première et celle du solvant [48]. (Il faut en effet tenir compte de la modification apportée dans la viscosité du milieu par l'addition de substances-tampon nécessaires pour maintenir le pH aux environs de 4,7, valeur optimum au cours de la réaction.)

Swyer et Emmens, pensant que le temps nécessaire pour atteindre le niveau de demi-viscosité du substrat ne donnait pas un index satisfaisant de la puissance de l'enzyme, modifièrent la méthode qui vient d'être exposée : ils proposent de mettre des quantités appropriées d'hyaluronate de K, tamponné, en présence d'enzyme à des dilutions variables (habituellement deux dilutions dont l'une est la moitié de l'autre). Ils déterminent le temps d'écoulement du mélange après avoir laissé la diastase pendant vingt minutes au contact du substrat. Si l'on représente par :

— F (s) le temps d'écoulement du substrat auquel on ajoute 0,5 cm³ d'une solution de gomme arabique pour remplacer l'enzyme;

— F (o) le temps d'écoulement des solvants sans hyaluronate de K;

— F (e) le temps d'écoulement du mélange enzyme-substrat après un contact de vingt minutes.

Les auteurs posent alors :

$$1.000\ \frac{F\,(s) - F\,(e)}{F\,(s) - F\,(o)} = \text{« V »}$$

et montrent que « V » (représentant le Flow Time Index, ou index de temps d'écoulement) est proportionnel au log. de la concentration en enzyme. Les avantages de cette réaction sont d'éliminer toutes causes d'erreur dues au viscosimètre.

et de permettre le dosage d'échantillons d'enzyme à partir de préparations standard d'hyaluronidase K [74].

Enfin Sherber, Birnberg et Kurzrok viennent récemment de mettre au point une méthode de dosage de l'hyaluronidase dans le sperme en se basant sur ce principe [70].

C. — Dosage par inhibition de formation d'un coagulum muqueux.

(Mucin Clot Prevention Test ou M. C. P.)

Seastone montre que l'addition d'acide acétique à une substance protéinique complexe donne lieu à la formation d'un coagulum muqueux (mucin clot) qui est détruit par l'enzyme [67-68].

Sur cette base, Mac Clean propose la méthode suivante : on prépare dans une série de tubes l'enzyme à des dilutions variables. On ajoute le substrat protéinique. L'hydrolyse de ce substrat se produit alors, et, si l'on ajoute dans tous les tubes de l'acide acétique, le coagulum ne se produira que dans les tubes où il restera du substrat. Si donc on examine la gamme des tubes à partir du tube témoin ne contenant pas d'hyaluronidase, on se rend compte que le coagulum muqueux, très net dans ce premier tube, devient de moins en moins important dans les tubes suivants, pour ne plus être qu'un voile léger, puis disparaître totalement dans les derniers tubes. Le premier tube absolument clair donne la dose d'hyaluronidase [46].

D. — Dosage turbidimétrique.

Kass et Seastone ont montré que l'acide hyaluronique mis en présence de protéines acidifiées produit un trouble dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'acide. Si l'on ajoute de l'hyaluronidase à ce mélange, l'acide hyaluronique se dépolymérisera, et le trouble diminuera. On mesurera cette diminution grâce à un colorimètre photo-électrique. Les

auteurs définissent alors arbitrairement l'unité de réduction de turbidité (Turbidity Reducing Unit, ou T. R. U.) comme étant la quantité d'hyaluronidase qui, en trente minutes, et à 37°, réduit la turbidité produite par 0,2 mg. d'acide hyaluronique à une valeur équivalente à celle que donne 0,1 mg. du même acide [33].

Léonard, Perlman et Kurzrok proposent de modifier cette méthode et utilisent le trouble produit par l'interaction de l'acide hyaluronique et de sérum sanguin acidifié. Ils mettent au point, à partir de ce principe, une technique que nous exposerons intégralement lorsque nous étudierons l'hyaluronidase dans le sperme [39].

E. — Dosage chimique.

Décrit par Meyer, il est basé sur la méthode suivante : on mesure les substances réductrices formées par l'hydrolyse des liaisons glucidiques de l'acide hyaluronique sous l'action de la diastase, ou les quantités d'acétylglucosamine libérées. Cette méthode est très complexe et son principe ne semble pas devoir être retenu pour servir de base à un dosage pratique [53].

Nous avons vu que ces méthodes aboutissent à différentes unités entre lesquelles il existe les relations suivantes :

1 M. C. P. = 0,16 V. R. U.
2 T. R. U. = 1 V. R. U.
100 M. C. P. = 0,56 « V ».

Ces méthodes ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients. C'est ainsi que la méthode utilisant le M. C. P. semble plus rapide que celle utilisant la mesure de diminution de viscosité. Dans le premier cas, le coagulum voit sa formation imbibée en moins de deux minutes, tandis qu'il faut compter en moyenne vingt minutes pour que la viscosité étudiée par la seconde méthode soit réduite de moitié.

Le procédé viscosimétrique fait entrer en jeu, outre une équation personnelle importante, de nombreux facteurs tels que la température, la pression, la mesure du temps d'écoulement. Sans doute, un appareillage adapté permet d'éliminer ces facteurs, mais dans une certaine proportion seulement. Il semble que la méthode turbidimétrique, dont les résultats sont donnés par simple lecture d'un colorimètre photo-électrique, soit la plus simple, et partant la plus précise.

Toutes ces méthodes de mesure et toutes ces unités ne sont malheureusement pas d'une constance absolue. On peut noter d'importantes variations suivant la source de l'enzyme, le substrat employé, et souvent, avec le même substrat, suivant le mode de préparation de celui-ci. Aussi doit-on reconnaître en toute objectivité avec les auteurs américains « qu'il n'existe encore aucune unité, et aucune mesure de l'activité de l'hyaluronidase qui soit digne de confiance » [17-79].

9° Rôle de l'hyaluronidase dans divers processus biologiques.

Ce rôle, étant donné la répartition de l'acide hyaluronique et de l'hyaluronidase dans la nature, est très étendu, et l'on peut penser que tout est loin d'avoir été découvert dans ce domaine étudié depuis peu de temps et qui semble s'élargir sans cesse [54].

Nous avons vu que l'hyaluronidase intervenait en diminuant la viscosité de l'acide hyaluronique, et partant en augmentant la diffusion dans l'organisme de diverses substances. Parmi les principaux phénomènes où elle intervient, nous pouvons citer : la diffusion de substances introduites sous la peau [48], de venins; la malignité de certaines tumeurs [3]; la perméabilité capillaire (1); l'invasion bactérienne [17]; la vitesse de sédimentation; la fécondation, etc.

(1) Des expériences récentes auraient permis à Chambers et Zweifach [6] de montrer que cette diastase n'interviendrait pas directement sur la perméabilité capillaire, mais accentuerait la fragilité capillaire.

Il nous est malheureusement impossible d'étudier ici tous ces phénomènes. Aussi nous bornerons-nous à voir quel rôle joue l'hyaluronidase dans la fécondation des œufs chez les mammifères et en particulier dans l'espèce humaine.

C'est cette étude que nous allons maintenant aborder. Elle comprendra deux parties. Dans la première, nous étudierons l'hyaluronidase dans le sperme, et dans la seconde, après un bref rappel du mécanisme de la fécondation, nous verrons où et comment intervient cette diastase.

DEUXIEME PARTIE

HYALURONIDASE ET FÉCONDATION

CHAPITRE PREMIER

HYALURONIDASE ET SPERME

Hoffmann et Duran Reynals [27] d'une part, et Mac Clean [42] d'autre part, avaient dès 1930 mis en évidence la présence de facteurs de diffusion dans les extraits aqueux de spermatozoïdes. Ces observations ont été confirmées par la suite. Sans doute, les extraits testiculaires contiennent beaucoup d'hyaluronidase; mais le sperme étant constitué par un ensemble d'éléments différents, on peut se demander à quelles parties du tractus génital mâle incombe le rôle de sécréter cet enzyme.

On est à peu près certain maintenant que l'hyaluronidase spermatique a une origine testiculaire. En effet, on connaît depuis longtemps la présence de cet enzyme dans les extraits de testicules de mammifère et plus particulièrement de taureau. D'autre part, on n'a jamais pu le mettre en évidence dans les autres parties du tractus génital [49]. Enfin il semble bien exister une relation entre la quantité d'hyaluronidase et le nombre de spermatozoïdes. Cette relation a été étudiée par différents auteurs et différentes méthodes, ce qui ne

peut que donner plus de poids aux conclusions qui, toutes, concordent.

Joel et Eichenberger, utilisant la méthode viscosimétrique de Madinaveitia et Quibbel, ont étudié les rapports existant entre le taux d'hyaluronidase et le nombre de spermatozoïdes dans plusieurs spécimens de sperme humain. Les résultats obtenus sont nets. Pour un sperme normal, le temps d'écoulement (inversement proportionnel, rappelons-le, à la quantité d'hyaluronidase) est de vingt-deux minutes en moyenne. Il passe à soixante-trois minutes en cas d'oligospermie, devient trop long à mesurer dans les conditions expérimentales en cas d'hypospermie, pour être indéterminable dans l'azoospermie [31].

Werthessen, Greenberg, Berman et Gargill obtiennent des résultats en tous points comparables en utilisant une méthode de dosage viscosimétrique dans laquelle le coefficient d'erreur n'est que de ± 7 %. Dans la numération des spermatozoïdes, le coefficient d'erreur serait de ± 20 %; aussi, certains de la relation existant entre enzyme et spermatozoïdes, ces auteurs proposent de substituer le dosage de l'enzyme à la numération des spermatozoïdes pour évaluer avec plus de précision la fertilité d'un sperme [76].

Ces mêmes auteurs [22] ont étudié ce rapport chez le lapin et le trouvent identique.

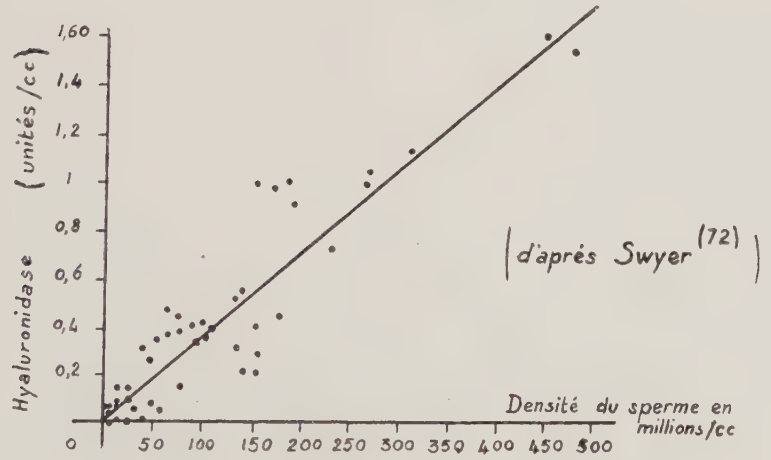
Pour Kurzrok, Léonard et Conrad, travaillant sur 90 échantillons de sperme humain venant de couples stériles, il existe un nombre critique; les auteurs ne peuvent mettre en évidence l'hyaluronidase lorsqu'il y a moins de 50 millions de spermatozoïdes par centimètre cube (38 cas étudiés, 4 exceptions). De 50 à 100 millions, la relation est directe, la quantité d'enzyme étant comprise entre 0,38 et 2 H. U. S. (1). Au-delà de 100 millions, ce rapport ne serait plus absolu :

(1) H. U. S. = Hyaluronidase Unit for Semen ou unité d'hyaluronidase pour le sperme. C'est la quantité d'enzyme contenue dans 1 cm³ de sperme et capable de dépolymériser 2,5 mg. d'acide hyaluronique dans des conditions précises d'expérience.

le cas 88, avec 362 millions par centimètre cube, contenait moins de 2 H. U. S., et, quelque temps après, ce même cas, avec 468 millions, n'avait que 2,2 H. U. S. Les auteurs signalent même plusieurs cas dans lesquels des spermes riches en spermatozoïdes (155 millions, cas n° 7, et 146 millions, cas n° 68) ne contenaient pas d'hyaluronidase [34]. Mais il ne faut pas oublier que ces résultats sont obtenus à partir de couples stériles et ne peuvent être, par conséquent, que défavorables à l'établissement d'une loi générale.

Plus intéressants à ce point de vue sont les résultats donnés par Swyer, qui a étudié ce rapport chez l'homme et chez différentes espèces d'animaux [72]. Il utilise pour le dosage de l'enzyme la méthode qu'il a préconisée avec Emmens en 1947. Celle-ci est basée sur le principe viscosimétrique, et l'unité d'activité de l'enzyme vaut 53,5 V. R. U. de Mac Clean et Hale. La numération des spermatozoïdes est faite avec un hémocytomètre. Les résultats obtenus sont les suivants :

1° Chez l'homme. — 58 échantillons de sperme ont été étudiés. Ils ont été obtenus par éjaculation (*coïtus interruptus*)



ou masturbation. Le condom n'a jamais été utilisé. Dans 4 cas d'azoospermie, on ne put mettre l'enzyme en évidence.

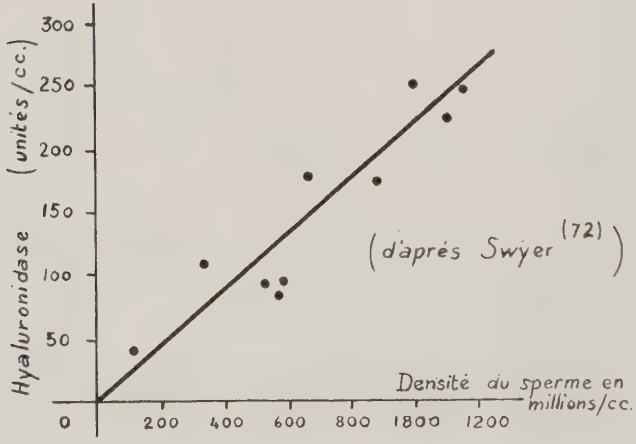
Au fur et à mesure que la densité en spermatozoïdes croît, le taux d'hyaluronidase croît aussi. Le rapport entre ces deux éléments serait remarquablement constant. Il a même été traduit mathématiquement par une courbe dont l'équation est :

$$y = 0{,}003369\ x + 0{,}024545,$$

y représentant le taux de l'enzyme en unités par centimètre cube et x le nombre de spermatozoïdes exprimés en millions par centimètre cube. La quantité d'hyaluronidase d'un sperme contenant 100 millions de spermatozoïdes par centimètre cube est d'environ 0,38 unités par centimètre cube.

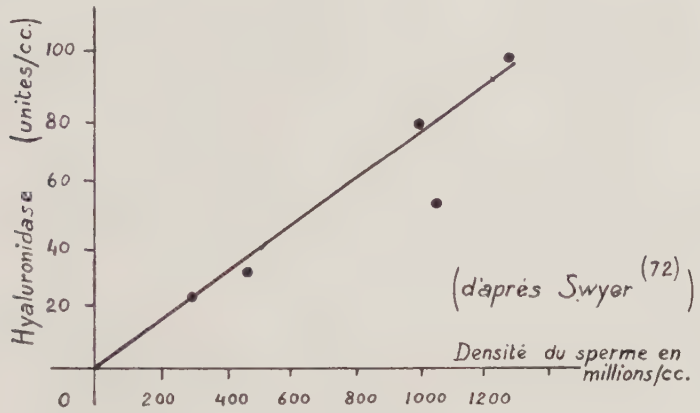
2° Chez les animaux. — Les échantillons de sperme ont été obtenus grâce à un vagin artificiel.

Le lapin. — 11 échantillons ont été étudiés. La numération révèle des chiffres variant entre 120 et 1.150 millions par centimètre cube. La proportion entre les deux éléments est très irrégulière.

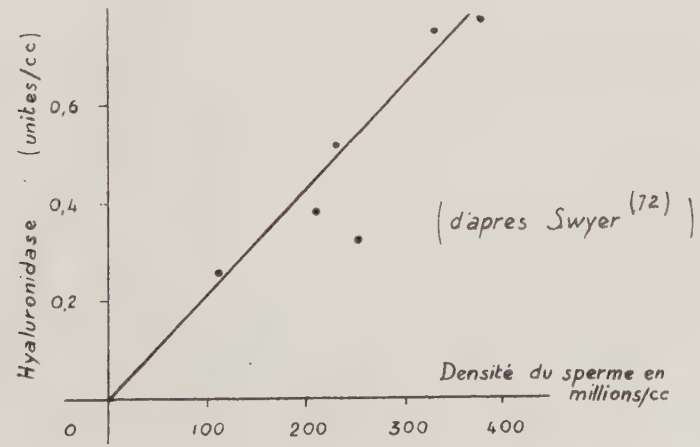


Le taureau. — Résultats identiques obtenus par l'étude de 5 échantillons. La numération donne des chiffres compris

entre 300 et 1.320 millions par centimètre cube; le taux de l'hyaluronidase varie entre 22 et 94 unités par centimètre cube. Ici encore la relation entre les deux éléments est présente.



Le porc. — L'étude a porté sur 6 spécimens. Mêmes constatations; la numération donne des chiffres compris entre 120 et 390 millions par centimètre cube, tandis que le taux de l'enzyme est compris entre 0,24 et 0,77 unité par centimètre cube. A une exception près, le rapport est remarquablement net.



Le chien. — 7 échantillons furent étudiés. Dans tous, on essaya de doser l'enzyme, mais quatre numérations seulement furent faites. On trouva :

4 millions par centimètre cube.	Hyaluronidase = 0
155 millions par centimètre cube.	Hyaluronidase = 0
300 millions par centimètre cube.	Hyaluronidase = 0
130 millions par centimètre cube.	Hyaluronidase = 0,28

Les 3 autres échantillons contenaient : l'un des traces d'enzyme; les deux derniers respectivement 0,015 et 0,025 unités par centimètre cube. L'auteur conclut que, chez cet animal, le taux de l'hyaluronidase est très bas, souvent trop bas pour être dosé par la méthode utilisée. Aussi n'a-t-on pas pu étudier le rapport chez cet animal.

Les oiseaux de basse-cour. — 10 échantillons de sperme ont été obtenus par stimulation manuelle. Sur deux de ceux-ci on a fait un dosage immédiat; sur les autres il a été fait vingt-quatre heures après l'obtention, mais une agglutination de spermatozoïdes se produisit qui rendit leur numération impossible. Il n'y a aucune raison cependant pour que cette agglutination ait faussé le dosage de l'hyaluronidase. Sur les 10 échantillons, 6 seulement semblent ne pas contenir de diastase. Les 4 autres en ont, mais à un taux très bas. De plus, la quantité de sperme recueillie est insuffisante et ne permet qu'une grossière approximation. On trouve dans les 4 échantillons, respectivement : 1 unité; 0,5 unité; 0,3 unité; et 0,05 unité par centimètre cube. La numération, qui ne fut faite que sur deux échantillons, permit de compter 4.600 et 2.500 millions par centimètre cube, et ces deux échantillons sont parmi ceux dans lesquels on ne put trouver trace d'enzyme.

Il semble donc qu'il y ait peu ou même qu'il n'y ait pas d'hyaluronidase dans cette espèce animale et qu'il n'existe pas de rapport entre celle-ci et le nombre de spermatozoïdes. Nous verrons, en étudiant le mécanisme de la fécondation, comment interpréter ce phénomène.

On peut donc considérer maintenant qu'il existe un rapport certain entre le taux de l'hyaluronidase et le nombre des spermatozoïdes. Ce rapport, variant d'une espèce à l'autre, serait sensiblement constant pour une espèce animale donnée; et si l'on ramène à 100 millions par centimètre cube le nombre des spermatozoïdes, la quantité d'hyaluronidase contenue dans un centimètre cube de sperme serait :

chez le lapin	20	unités
chez le taureau	7	unités
chez l'homme	0,4	unité
chez le porc	0,2	unité

En résumé, nous pouvons dire que l'hyaluronidase spermatique est d'origine testiculaire, car :

— cette diastase est présente dans les extraits testiculaires de plusieurs espèces de mammifères;

— chez ces mammifères, elle est absente dans les autres parties du tractus génital;

— il existe une relation certaine entre le taux de cette diastase et le nombre de spermatozoïdes.

Swyer a montré [73] que la majeure partie (au moins les 3/4) de l'hyaluronidase du sperme éjaculé est associée à la fraction spermatozoïde, le reste pouvant être regardé comme libéré par ceux-ci dans le plasma séminal.

On peut alors entrevoir deux possibilités : ou bien l'hyaluronidase est d'origine testiculaire « directe » et a pour source l'épithélium germinal lui-même, ou bien elle est d'origine « indirecte » et est sécrétée par les spermatozoïdes. Nous allons montrer que, dans l'état actuel de nos connaissances, c'est la première hypothèse qui semble la plus vraisemblable.

Déjà, en 1931, Hoffmann et Duran Reynals pensaient que la formation de l'hyaluronidase était liée à l'activité de l'épithélium séminal qui serait la source de cet enzyme [28].

Joel et Eichenberger confirment ces vues et, étudiant la

morphologie des spermatozoïdes, en arrivent à conclure que l'épithélium germinal produit de l'hyaluronidase, qu'il donne des spermatozoïdes normaux ou même des formes moins mûres [31, 32].

Kurzrok, Léonard et Conrad estiment aussi qu'il n'y a pas de relation sensible entre la production de l'enzyme et la qualité de la spermatogénèse. Il faut seulement que celle-ci ait lieu chez l'homme; dans aucun cas d'azoospermie on n'a encore pu mettre en évidence l'hyaluronidase [34].

Swyer montre par deux exemples que si, pour une raison quelconque, la spermatogénèse n'a pas lieu, il est impossible de trouver de l'hyaluronidase dans les extraits testiculaires [73].

— Un lapin mâle qui donnait régulièrement un échantillon de sperme chaque semaine pendant quinze semaines se révéla atteint d'une ectopie testiculaire congénitale. A la numération, on comptait 115 à 820 millions de spermatozoïdes par centimètre cube. Le testicule normal contenait 62,5 unités d'hyaluronidase et pesait à l'état frais 1,94 g, tandis que le testicule ectopique pesait 0,25 g dans les mêmes conditions, et on peut y déceler la présence d'hyaluronidase.

— On examina à ce point de vue également les testicules d'un jeune lapin de vingt-sept jours. Ils pesaient chacun 45 mg. On ne put mettre en évidence d'hyaluronidase.

Ce même auteur a montré que les spermatozoïdes étaient en quelque sorte le véhicule de l'hyaluronidase, mais ne la sécrétaient pas. On utilise pour son expérimentation du sperme de lapin obtenu par la technique du vagin artificiel. Le dosage de l'enzyme est fait en utilisant la méthode de Swyer et Emmens. La méthode d'extraction proposée est simple, et nous allons l'exposer en détail, car elle est nécessaire pour donner tout leur poids aux faits que nous rapporterons ensuite.

Mac Clean avait montré que les extraits de spermatozoïdes dans l'eau distillée contenaient de grandes quantités d'hyaluronidase maxima soit après une courte congélation à — 10° C,

soit après un séjour assez prolongé à 0° C. Une congélation plus prolongée à — 10° C ne permet pas d'obtenir une plus grande quantité d'enzyme, pas plus d'ailleurs qu'elle ne diminue la quantité susceptible d'être extraite. Les échantillons de diastase obtenus par cette méthode de dessiccation à froid conserveraient leur pouvoir plus de six mois. En outre l'extraction serait totale, car, après broyage des spermatozoïdes dans du sable, il est impossible de mettre en évidence une quantité quelconque de la diastase dans ce reliquat. Cette méthode montre la possibilité d'extraire l'enzyme des spermatozoïdes morts.

On sait que les spermatozoïdes peuvent être conservés vivants assez longtemps en solution de Baker.

Des spermatozoïdes mis dans cette solution sont successivement gelés puis dégelés, et on dose l'hyaluronidase. D'autres spermatozoïdes du même échantillon de sperme sont étudiés par la même méthode, après une mise en suspension dans l'eau. On trouve les mêmes quantités d'hyaluronidase. Donc la solution de Baker n'intervient ni dans un sens ni dans l'autre sur la libération de l'enzyme.

Toujours à partir du même échantillon de sperme, Swyer étudie alors les quantités d'hyaluronidase présentes au bout de temps variables dans un échantillon d'eau et dans un échantillon de la solution de Baker (le temps pour chacun de ces deux échantillons étant le même). On trouve que les quantités d'enzyme libérées sont les mêmes, aux erreurs d'expérimentation près.

En conséquence, l'apparition de l'hyaluronidase au sein du liquide dans lequel les spermatozoïdes sont en suspension (que ce soit l'eau ou que ce soit la solution de Baker) se fait en quantités égales.

C'est alors que Swyer étudie des échantillons du même sperme dans des conditions différentes :

— Suspension aqueuse congelée immédiatement;

— Suspension en solution de Baker chauffée immédiatement à 56° C pendant trente minutes pour tuer les spermatozoïdes;

— Suspension en solution de Baker au bout de vingt-quatre heures dans laquelle les spermatozoïdes sont bien vivants.

On dose l'enzyme dans ces trois solutions et l'on obtient les résultats suivants :

Suspension 1 : 66 unités;
Suspension 2 : 56 unités;
Suspension 3 : 60 unités.

(Dans la suspension 2, le chiffre trouvé, un peu faible par rapport aux deux autres, peut s'expliquer par une légère destruction de la diastase sous l'action de la chaleur.)

Cette expérience montre qu'il n'y a pas eu de variation dans la quantité d'enzyme présente dans les suspensions, que le dosage ait été fait immédiatement ou qu'il ait été fait vingt-quatre heures après. Il semble donc que les spermatozoïdes ne sécrètent pas la diastase, et, en conséquence, ne seraient pour elle qu'un véhicule.

A. — ***Libération de la diastase par les spermatozoïdes.***

Si l'on dose les quantités d'hyaluronidase contenues dans une solution de Baker au bout de différents laps de temps, on voit que les quantités d'hyaluronidase libérées sont les suivantes :

Après 5 minutes	18,5 unités
Après 25 minutes	17,5 unités
Après 50 minutes	18 unités
Après 80 minutes	19 unités

La libération semble donc rapide, sans que l'on puisse donner aucune précision sur la vitesse à laquelle elle se fait. Elle semble atteindre très tôt un maximum; d'autre part, la présence d'hyaluronidase dans une solution de Baker réduit la mise en liberté de cet enzyme par les spermatozoïdes. On peut penser qu'il existe une régulation dans ce système : les

spermatozoïdes maintiendraient le milieu qui les entoure à une certaine concentration en hyaluronidase dont ils sont chargés.

Récemment, Léonard, Perlman et Kurzrok, étudiant l'action de la prostate et des vésicules séminales sur l'hyaluronidase produite par des extraits de testicules de rats homogénéisés, ont confirmé ce qui avait été déjà prouvé, à savoir que ces parties du tractus génital ne sécrètent pas d'enzyme [40-63]. Cependant elles permettraient aux spermatozoïdes d'en libérer une plus grande partie; et c'est dans ce sens que vésicules séminales et prostate joueraient un rôle dans la présence de la diastase au sein du plasma séminal.

En résumé, l'hyaluronidase spermatique, d'origine testiculaire certaine, n'est pas sécrétée par les spermatozoïdes: sa présence est en rapport avec l'activité de l'épithélium germinal. Il existe une relation entre le taux de cette diastase et le nombre de spermatozoïdes. Ceux-ci lui servent de véhicule et maintiennent dans le milieu qui les entoure une certaine concentration en enzyme.

B. — *Dosage de l'hyaluronidase dans le sperme.*

Tous les principes de dosage dont nous avons déjà parlé ont été utilisés avec quelques modifications pour mesurer le taux de l'hyaluronidase dans le sperme.

Nous allons rapporter ici, en citant le texte même des auteurs, la méthode mise au point par Léonard, Perlman et Kurzrok [89], basée sur le principe turbidimétrique de Seastone, dont nous avons déjà parlé lors de l'étude générale des différentes méthodes de dosage (cf. p. 27).

Méthode.

a) Les réactifs.

— *Solution d'acide hyaluronique* : Dissoudre 20 mg. d'acide hyaluronique dans 50 c^3 d'une solution tampon à l'acétate, solution M/10 (pH 6) et tiédir la solution pendant plusieurs

heures à 37° C approximativement pour obtenir une dissolution complète. Puis centrifuger ou filtrer la solution pour la clarifier. Cette solution est stable pendant plusieurs semaines si elle est conservée à basse température (10° C).

L'acide hyaluronique peut être obtenu à partir de différentes sources : humeur vitrée d'yeux de bestiaux, liquide synovial, cordons ombilicaux humains (Meyer et Palmer, 1936; Mac Clean, 1943). L'humeur vitrée se révéla être la source la plus satisfaisante en raison de sa facilité d'obtention et de la simplicité de la préparation.

— Acide acétique M/2;
— Solution d'acétade de soude;
— Solution tampon à l'acétate M/10 (pH 6). Mélanger une partie de l'acide acétique avec 20 parties de la solution d'acétate de soude et diluer la solution au 1/5.

— *Solution tampon à l'acétate* M/2 (pH 4,2) : Mélanger 28 parties d'acide acétique M/2 avec 10 parties de la solution d'acétate de soude M/2.

— *Sérum sanguin acidifié :* Ajouter 5 cm³ de sérum frais de cheval, de lapin ou de mouton à 45 cm³ de solution tampon à l'acétate M/2 (pH 4,2). Ajuster le PH de la solution à 4,2 avec l'électrode de verre. Le mélange devra attendre vingt-quatre heures avant d'être utilisé. Il est préférable de se servir d'un sérum frais (de moins de deux à trois semaines) parce que ce sérum, acidifié ou non, subit une modification qui donne des valeurs de turbidité plus basses et par conséquent souvent inutilisables.

b) Appareils :

— *Colorimètre :* Pour déterminer la turbidité, on a utilisé un colorimètre photo-électrique Klett Summerson, avec filtre rouge n° 66.

— *Tubes colorimétriques :* Il est indispensable d'utiliser des tubes soigneusement étalonnés. Les tubes dits « étalon-

nés » que l'on trouve dans les maisons de fournitures présentent des variations qui peuvent aller jusqu'à 10 unités de mesure. Pour éviter ces inconvénients, on choisit un tube comme référence et on lui compare les autres tubes que l'on classe en trois catégories : ceux qui montrent des différences allant de 0 à 3, de 4 à 6 et de 7-8 unités. Habituellement on n'utilise pour les dosages que les tubes d'un seul groupe, et on introduit un facteur de correction appropriée si on utilise les autres.

— *Etuve :* Les réactions diastasiques auront lieu dans une étuve à la température de 37° C.

c) Technique turbidimétrique :

Pour doser une préparation donnée d'enzyme, la solution d'enzyme de concentration choisie et la solution d'acide hyaluronique sont portées à 37° C. Dans un tube colorimétrique, on mélange intimement 0,5 cm³ de la solution d'enzyme et 0,5 cm³ de substrat (contenant par conséquent 0,2 mg. d'acide hyaluronique), et on laisse le mélange à 37° C pendant trois minutes. Les tubes sont alors refroidis dans un bain de glace pendant cinq minutes et on ajoute successivement 3 cm³ de la solution tampon à l'acétate (pH 4,2), puis 1 cm³ de sérum sanguin acidifié. On homogénéise le contenu du tube en retournant celui-ci trois fois et on mesure au colorimètre. La valeur de turbidité est alors donnée par le nombre de divisions lues sur l'échelle du colorimètre. Pour pouvoir rapporter ce résultat à une valeur de turbidité connue, il est nécessaire de préparer deux standards, que l'on désigne sous les termes de « standard à 0,2 mg. » et « standard à 0,1 mg. ». Ils sont préparés pendant la durée de la détermination, et il suffit de les déterminer une fois chaque jour pour toutes les mesures de la journée.

Le standard à 0,2 mg. est préparé en versant successivement dans un tube du colorimètre :

— 0,5 cm³ de la solution substrat;
— 0,5 cm³ de la solution tampon à l'acétate (pH 6);

— 3 cm³ de la solution tampon à l'acétate (pH 4,2);
— 1 cm³ de sérum sanguin acidifié.

Le « standard à 0,1 mg. » est préparé de la même manière, avec les mêmes quantités de produit, sauf pour la solution de substrat dont on ne met que 0,25 cm³, tandis que l'on met 0,75 cm³ de solution tampon à l'acétate (pH 6).

Les valeurs de turbidité sont lues au bout de trente minutes. Elles correspondent à la turbidité du standard à 0,2 et du standard à 0,1.

La concentration de l'enzyme qui réduit la turbidité produite par 0,2 mg. d'acide hyaluronique à la turbidité produite par 0,1 mg. est dite contenir 1 T.R.U.

Cette technique a été utilisée, telle qu'elle vient d'être décrite par les auteurs, pour le dosage de l'hyaluronidase dans les extraits testiculaires de taureau. Pour le dosage dans le sperme, elle doit être légèrement modifiée. Nous ne rapporterons ici que les modifications ayant trait à la mesure de l'activité de l'enzyme dans le sperme humain.

— Tout d'abord, le sperme humain n'étant pas très riche en hyaluronidase, on utilisera des dilutions comprises entre 1/10 et 1/100e.

— De plus, le dosage se faisant non sur la totalité du sperme, mais sur le seul plasma séminal, il est nécessaire de supprimer les spermatozoïdes. Pour ce faire, on mettra dans un tube test de 3 cm³, 0,25 cm³ de sperme homogène auquel on ajoutera 2 cm³ de solution tampon à l'acétate (pH 6). On centrifuge le mélange à 2.000 t/min. pendant 20 minutes, puis on filtre. Un centimètre cube de ce filtrat est redilué dans un centimètre cube de la même substance tampon.

Le dosage est alors fait sur ces deux centimètres de liquide (dont la concentration en plasma séminal est alors de 1/18e).

Nous rapporterons ici à titre d'exemple le protocole typique de dosage de sperme, avec la méthode pour calculer la concentration en enzyme. Les volumes des différentes solu-

tions tampon et du sérum sanguin sont exprimées en centimètres cubes.

Solution au 1/18e Volume utilisé	0,50		0,20		0,10	
	Tube A	Tube B	Tube A	Tube B	Tube A	Tube B
Sol. tampon à pH 6	»	»	»	»	»	»
Sol. du substrat	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Ajouter les quantités suivantes (en cm3) dans chaque tube; laisser 30 minutes à 37° C, puis refroidir 3 minutes.						
Sol. tampon à pH 4,2	3	4	3	4	3	4
Sérum sanguin acidifié (1)	1	»	1	»	1	»
Mélanger. Lire la valeur de turbidité après 30 minutes au colorimètre photoélectrique.						
Résultats lus	15	15	20	10	25	7
Résultats corrigés	0		+ 10		+ 18	

(1) On remarquera que deux tubes A et B sont utilisés pour l'étude de chaque volume de la solution. En effet, le plasma séminal dilué n'est pas absolument clair, et cet élément introduit une perturbation dans la mesure de la variation de la turbidité. Aussi, dans les tubes B on ne met pas de sérum sanguin acidifié, de façon que la réaction ne puisse avoir lieu; ainsi, en faisant la différence entre la turbidité totale du tube A et la turbidité « parasite » du tube B, on aura la valeur réelle de la turbidité susceptible d'avoir varié sous l'action de la diastase. Cette valeur est portée sur le tableau à la ligne « résultats corrigés ».

D'autre part, on a étalonné la valeur de turbidité des solutions standard de 0,2 mg. et 0,1 mg. d'acide hyaluronique.

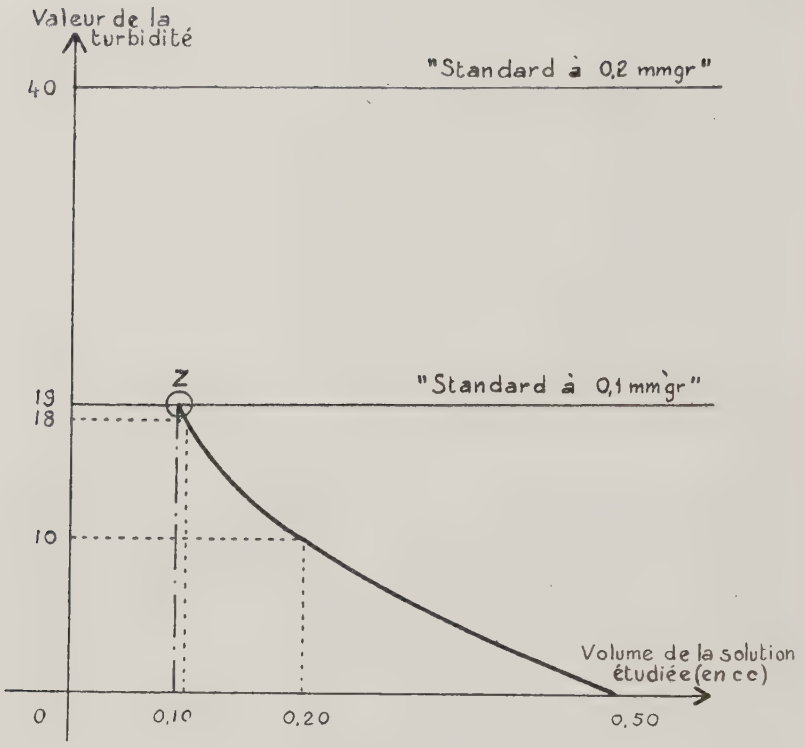
Supposons que :

Il suffit de reporter les valeurs données par le colorimètre sur un graphique dans le genre de celui-ci et de faire la courbe.

Cette courbe coupe la ligne d'ordonnée 19 au point Z. L'abscisse de ce point donne le volume de la solution étudiée contenant 1 T.R.U. par définition.

Ici, cette abscisse a pour valeur approximative 0,1. Donc 0,1 cm³ d'une solution de plasma séminal à 1/18e contient 1 T.R.U., et par conséquent 1 cm³ de plasma séminal étudié contenait 18 × 10 = 180 T.R.U.

Cette méthode, dont l'exposé peut sembler assez complexe au premier abord, est en réalité assez simple puisqu'il suffit de mettre dans quelques tubes différentes quantités de plu-



sieurs produits, puis de lire un résultat sur le colorimètre photo-électrique. Le reste est du domaine mathématique. L'appareillage est simple et facile à utiliser. En un mot, il semble que cette méthode soit la plus satisfaisante parmi toutes celles qui ont été proposées jusqu'ici.

CHAPITRE II

ROLE DE L'HYALURONIDASE DANS LA FÉCONDATION

L'hyaluronidase étant présente dans le sperme et ayant certains rapports que nous venons d'étudier avec les spermatozoïdes, on a pensé qu'elle jouait un rôle dans la fécondation. C'est ce rôle que nous allons maintenant étudier. Mais auparavant, dans le seul but d'être précis, nous allons brièvement rappeler le mécanisme de l'ovulation, de l'ascension des spermatozoïdes et de la rencontre de ces deux éléments.

L'ovulation. — Des travaux récents du Professeur G. Dubreuil [12] permettent de comprendre ce phénomène resté jusqu'alors assez mal expliqué. Au moment de la rupture du follicule, qui se ferait sous l'action d'une diastase sécrétée par les cellules péri-ovocytaires, l'ovule se trouve enchâssé au milieu d'un ensemble de cellules de la granulosa, formant autour de lui la « corona radiata » et le « cumulus proliger » [61]. C'est tout cet ensemble qui va quitter en bloc le sac folliculaire pour tomber « en bavant » dans la bourse ovarienne. Lors de l'œstrus, la congestion des annexes a eu pour résultat l'exsudation d'une sérosité péritonéale. Celle-ci, comme l'a montré le Professeur G. Dubreuil, est réabsorbée au niveau des nombreux lymphatiques contenus dans les franges du pavillon et dans les plis de l'ampoule tubaire; ainsi se crée un courant liquidien dirigé vers le pavillon et l'ampoule, entraînant l'ovule avec lui.

Au niveau de l'ampoule viendrait s'ajouter à ce courant l'action des cils de cellules ciliées présentes à cet endroit.

Dans l'isthme et la portion interstitielle, le courant est inexistant, il y a peu de cellules ciliées, et l'ovule continuerait son trajet grâce aux mouvements péristaltiques de la trompe.

Ce transit durerait cinq jours au maximum. Rapide dans l'ampoule, il serait plus lent au début de l'isthme, pour redevenir rapide à la fin de l'isthme et dans la portion interstitielle.

L'ascension des spermatozoïdes. — Déposés dans le fond du vagin, au niveau du cul-de-sac postérieur, ils vont remonter au-devant de l'ovule jusqu'au tiers externe de la trompe, quelquefois plus loin. Le mécanisme de leur ascension est encore fort discuté. Pour les uns, il y aurait aspiration du sperme par l'utérus, en particulier au moment de l'orgasme. Pour les autres, cette action mécanique n'a pas lieu, et c'est par leurs propres moyens que les spermatozoïdes franchiraient le col et arriveraient dans l'utérus. Il semble que ce soit cette seconde hypothèse qui paraisse la plus vraisemblable [22].

Au niveau du col utérin, ils rencontrent une matière muqueuse, produit de sécrétion de l'épithélium, le mucus cervical ou glaire cervicale filante, qui semble présenter un intérêt primordial dans le phénomène de la fécondation; en effet, si, dans les cas normaux, ce mucus se laisse facilement pénétrer par les spermatozoïdes, il est d'autres cas où, à la suite d'une altération, il leur oppose une barrière infranchissable.

La rencontre de l'ovule par les spermatozoïdes. — Après avoir traversé le mucus, les spermatozoïdes montent et rencontrent l'ovule. Mais, comme nous l'avons vu, celui-ci n'est pas seul. Il est entouré d'un manchon de cellules qui s'oppose à leur pénétration. La fécondation ne peut avoir lieu que si ces cellules sont dispersées, faute de quoi l'ovule meurt très rapidement.

Nous voyons donc que, dans leur trajet, les spermatozoï-

des rencontrent deux obstacles essentiels qu'ils doivent vaincre pour que la fécondation puisse avoir lieu:

— le mucus cervical;

— le manchon cellulaire qui isole l'ovule du milieu environnant.

Ce sont ces deux obstacles que nous allons maintenant étudier, et nous allons voir quel rôle peut jouer l'hyaluronidase pour les lever.

Pénétration des spermatozoïdes dans le mucus cervical.

Nous n'étudierons ici que le mucus cervical normal, laissant de côté les sécrétions cervicales pathologiques (purulentes par exemple), qui sont un obstacle évident pour le passage des spermatozoïdes.

La pénétration de la sécrétion cervicale par ces éléments est sous la dépendance de plusieurs facteurs, parmi lesquels on peut citer : le pH, la concentration en eau, le volume, la composition chimique (présence de sucre), la viscosité etc. [17]. Tous ces facteurs sont d'inégale importance. Celui qui semble prépondérant et qui résumerait en quelque sorte tous les autres est la viscosité.

Seguy et Vimeux ont été parmi les premiers à l'étudier [69]. En 1934, Moench insistait sur l'importance de ce facteur, qui conditionne presque exclusivement la pénétration. Lamar, Shettles et Delfs ont montré [36] que cette pénétration se faisait au moment où le mucus est le plus fluide. Ils utilisent pour cette étude une méthode dérivée du test de Miller et Kurzrok. Dans un tube capillaire, ils déposent une parcelle de glaire cervicale à laquelle ils ajoutent une petite quantité de sperme, en ayant soin de laisser pénétrer entre ces deux milieux une petite bulle d'air, ce qui rendra l'observation plus facile. Ils remarquent que les glaires qui se laissent le plus facilement pénétrer sont celles qui ont été prélevées chez des femmes au milieu du cycle,

donc à une date correspondant approximativement à la période d'ovulation. Dans ces conditions, les spermatozoïdes se déplacent très rapidement, pouvant arriver à parcourir 2 à 3 millimètres à la minute. C'est à ce moment que la viscosité est la plus basse.

Si l'on compare la viscosité du mucus cervical au cours du cycle avec d'autres phénomènes concomitants, tels que le volume du mucus, la température de l'organisme, on est frappé par le parallélisme qui existe dans leurs variations : au moment de la chute de la température, considérée par Palmer comme coïncidant avec l'ovulation, correspondent : 1° une viscosité minimum et un volume maximum de la glaire (ce volume pouvant atteindre 12 fois le volume normal du début ou de la fin du cycle; cette augmentation serait rapide, et aussi rapide serait sa diminution); 2° une pénétration maxima des spermatozoïdes. Celle-ci se ferait à une vitesse de 3 mm./min. ou plus, alors qu'elle n'est que de 0,25 mm./min. ou moins au début ou à la fin du cycle [75].

Ces résultats ont été confirmés par Pommerenke et Rochester. Ces auteurs ont mesuré le temps nécessaire à une certaine quantité de mucus pour traverser dans des conditions précises une certaine longueur de tube capillaire. Un temps de 100 secondes est considéré comme normal au début et à la fin du cycle. La même quantité de sécrétion cervicale, dans les mêmes conditions expérimentales, n'en demande que 2 ou 3 si le mucus a été prélevé au milieu du cycle [65].

Il ne semble donc pas douteux que le mucus cervical subisse des variations au cours du cycle œstral : augmentation de volume, diminution de la viscosité, toutes variations qui ont pour but de favoriser au maximum la pénétration des spermatozoïdes.

Cette pénétration a été étudiée par de nombreux auteurs. Elle se fait suivant un mécanisme particulier : *in vitro*, on voit les spermatozoïdes se masser à la limite du mucus cervical, puis peu à peu progresser en « caravanes », comme dans une faille que produiraient les spermatozoïdes de tête.

Kurzrok et Miller, qui ont décrit cette progression, ont pensé voir là un mécanisme diastasique et ont poursuivi des recherches dans ce sens [35]. Celles-ci permirent de supposer la présence au sein du plasma séminal d'une substance thermolabile, non dialysable, présentant certains caractères spécifiques des diastases.

Cette idée sembla recevoir confirmation lorsqu'on se rendit compte expérimentalement que les sécrétions cervicales semblant présenter tous les caractères requis pour une bonne pénétration (viscosité basse, pH alcalin, absence d'éléments cellulaires, volume suffisant, etc.) ne permettaient pas aux spermatozoïdes de pénétrer, ou du moins, s'ils y arrivaient, d'aller plus avant. Ces éléments étaient rapidement bloqués sur place.

A la suite de la découverte de l'acide hyaluronique et de l'hyaluronidase, on a voulu faire un rapprochement entre l'action de l'enzyme spermatique, dont on soupçonne la présence sur le mucus cervical, et l'action de l'hyaluronidase sur l'acide hyaluronique.

Il semble bien, dans l'état actuel de nos connaissances, que l'hyaluronidase n'agisse pas sur le mucus cervical. Et les preuves que nous allons apporter sont d'ordre expérimental, chimique et embryologique.

1° *Arguments expérimentaux.* — Mac Clean et Rowlands [49] (observations non publiées, mais citées par différents auteurs) ont recherché l'action de l'hyaluronidase sur le mucus cervical de la vache, pendant et en dehors de l'œstrus. A aucun moment ils ne purent observer une diminution de la viscosité de ce milieu.

2° *Arguments chimiques.* — Mme F. Moricard rapporte quelques succès obtenus dans le traitement par l'hyaluronidase de certaines stérilités. Elle étudie les variations de la charge glucidique de la glaire au cours du cycle ovarien, montre qu'elles sont un reflet de la fonction endocrine de l'ovaire et de la surrénale, et ajoute : « Il est vraisemblable qu'une

partie des glucides polymérisés (mucines) contenus dans la glaire sont en partie responsables de la viscosité de la glaire. On peut admettre que cette viscosité est modifiée par la présence d'hyaluronidase contenue dans le liquide péri-spermatique, cette hypothèse étant étayée par certains travaux de Joel. » [60].

Il est possible que des glucides polymérisés contenus dans la glaire soient en partie responsables de sa viscosité. Mais on sait que l'acide hyaluronique est un composé chimique bien défini, sur lequel seul peut agir l'hyaluronidase. Or on n'a encore jamais pu mettre en évidence cet acide dans le mucus. Et s'il existe dans le sperme une diastase capable de diminuer la viscosité de la sécrétion cervicale, on peut affirmer, pour les raisons embryologiques que nous allons maintenant étudier, qu'il n'y a pas d'acide hyaluronique dans ce mucus, et que, par conséquent, en aucun cas l'hyaluronidase ne saurait diminuer la viscosité de ce milieu.

3° *Arguments embryologiques.* — Il a été prouvé que l'acide hyaluronique ne se rencontre que dans les tissus d'origine mésodermique. Or le mucus cervical est sécrété par des cellules épithéliales; il semble dès lors assez difficile que la sécrétion cervicale contienne cet acide, et, en conséquence, que l'hyaluronidase agisse sur la viscosité de ce milieu. Les auteurs américains, qui ont beaucoup plus étudié cette question, sont beaucoup plus affirmatifs sur ce point.

Il semble que Mme Moricard ait été victime de cette terminologie défectueuse dont nous avons déjà parlé et ait vu en l'hyaluronidase une « mucinase » agissant sur le « mucus » cervical. D'ailleurs, elle ne fait qu'émettre une hypothèse et relate ses succès dans l'emploi de l'enzyme, sans préciser le niveau où il agit.

En résumé, dans l'état actuel de nos connaissances, il ne paraît pas possible que l'hyaluronidase agisse sur la viscosité du mucus cervical. Il est prouvé que cette viscosité subit au cours du cycle œstral des variations importantes qui sont sous la dépendance d'hormones œstrogènes [36-65].

Etant donné le mécanisme de pénétration des spermatozoïdes, une action diastasique complémentaire n'est pas exclue, mais elle semble bien distincte de celle de l'hyaluronidase.

Dénudation de l'ovule.

La pénétration d'un spermatozoïde n'est possible que lorsque le manchon de cellules de la « corona radiata » et du disque « proliger » qui entoure l'ovule a disparu. Or toutes ces cellules sont cimentées par un gel visqueux qui, s'il n'est pas de l'acide hyaluronique pur, en contient du moins des quantités importantes [49-66]. La dénudation de l'ovule semble bien être le fait de l'hyaluronidase. Ici encore les arguments sont de plusieurs ordres, et nous allons les examiner successivement.

1° *Arguments embryologiques.* — De nombreuses théories ont été émises au sujet de l'origine embryologique des différents constituants de l'ovaire. Suivant la théorie classique, l'épithélium germinal émettrait une première série de cordons cellulaires, destinée normalement à disparaître. Celle-ci serait suivie d'une deuxième série, les cordons de Valentin Pflügger, qui donneraient au sein du tissu mésenchymateux des îlots épithéliaux. Ceux-ci seraient à l'origine des follicules (ovocytes et cellules folliculeuses).

Or, Novak (1947), se faisant l'écho de Fischel, Meyer, Politzer et autres auteurs, nous dit : « On pense de plus en plus, à la suite de ces chercheurs, que la granulosa, par exemple, est formée par une différenciation du mésenchyme ovarien *in situ*. En accord avec cette hypothèse, que je crois être correcte, les cellules mésenchymateuses peuvent être à l'origine soit des cellules granuleuses soit des cellules thécales, et ceci permet d'expliquer certaines caractéristiques des tumeurs de la granulosa et des tumeurs thécales dans une période plus avancée de la vie. Entre autres choses, une origine mésenchymateuse commune explique la parenté fonc-

tionnelle et l'apparente interchangeabilité histologique des cellules thécales et des cellules de la granulosa. » [62].

On voit toute l'importance de cette théorie : les cellules de la granulosa étant d'origine mésenchymateuse, il est logique de penser que le ciment qui les unit contient de l'acide hyaluronique. On comprend alors que l'hyaluronidase puisse libérer l'ovule de son manchon cellulaire.

2° *Arguments expérimentaux.* — Long, dès 1912, avait montré que l'ovule est entouré d'un gel transparent, visqueux, fluide, dans lequel les cellules du disque « proliger » et de la « corona radiata » sont enveloppées, et que la désintégration de tout ce système est nécessaire pour que la fécondation puisse avoir lieu.

En 1930, Yamane, comparant la fécondation de lapines avec des mâles, les uns vasectomisés, les autres non vasectomisés, trouva que, dans le premier cas, l'ovule était encore entouré de son manchon cellulaire, tandis qu'il ne l'était plus dans le second cas : la fécondation s'était produite, et déjà la segmentation de l'œuf avait commencé. L'auteur suggéra alors la possibilité d'une action diastasique, et obtint la dénudation de l'ovule de la lapine en le soumettant à l'action d'extraits pancréatiques.

En 1936, Pincus et Enzmann confirment l'action d'une substance thermolabile [64]. En utilisant la trypsine, ils obtiennent la dénudation de l'ovule, mais celui-ci avait été partiellement attaqué par l'enzyme. Ils en concluent que la disparition du manchon cellulaire n'est probablement pas le fait d'une diastase protéolytique de ce genre. Et l'étude du sperme de différents animaux leur montre qu'il n'est pas nécessaire que sperme et ovule proviennent d'animaux d'espèces homologues pour que la libération de l'ovule ait lieu.

A la suite de la découverte de l'hyaluronidase dans le sperme, Mac Clean et Rowlands pensèrent que cette diastase pouvait avoir une action dans cette phase de la fécondation, et ils expérimentèrent sur des rats [49]. Prenant des ani-

maux impubères, ils provoquèrent chez eux l'ovulation et prélevèrent les ovules. Dans un verre de montre, 0,2 cm^3 d'une solution de NaCl à 0,8 % furent déposés, dans lesquels on ajouta un volume égal d'enzyme dilué (obtenu par chauffage à 50° C pendant cinq minutes pour détruire les spermatozoïdes). Puis 6 à 12 ovules furent déposées dans ce mélange et l'on observa la vitesse de dispersion des cellules, qui peu à peu se détachèrent pour tomber au fond du verre. Dans aucun cas les ovules ne furent abîmés par l'enzyme. Celui-ci fut utilisé à différentes concentrations et dosé en V. R. U. En comparant le taux de l'enzyme et la vitesse de dispersion, on obtint les résultats suivants :

pour un taux de 0,6 V. R. U., durée de la dispersion : 165 min.
pour un cas de 15 V. R. U., durée de la dispersion : 20 min.
pour un cas de 85 V. R. U., durée de la dispersion : 9 min.

Des résultats similaires furent obtenus par Fekete et Duran Reynals en utilisant un enzyme de source différente : extraits de testicules, sperme, extraits de sangsues, venins de serpents. Ces auteurs montrèrent même qu'en utilisant des doses suffisantes d'hyaluronidase obtenue à partir d'extraits de testicules de taureau, le temps nécessaire à la dénudation de l'ovule pouvait être abaissé à 60 secondes [21].

D'autre part, nous devons rappeler que lors de l'étude par Swyer de l'hyaluronidase dans le sperme de différents animaux, l'auteur ne put mettre cet enzyme en évidence dans le sperme des oiseaux [72]. Fekete et Duran Reynals n'en trouvèrent ni dans le sperme des reptiles ni dans celui des amphibiens ou des oiseaux [21]. Et l'on sait que, chez ces animaux, l'œuf ne présente ni « cumulus proliger » ni « corona radiata » qui puisse s'opposer à la pénétration des spermatozoïdes.

La dispersion des cellules sous l'action de la diastase a servi de base à une méthode de dosage de cet enzyme. Léonard et Kurzrok [38] définissent l'unité d'ovule de rat (Rat Ova Unit, ou R. O. U.) comme la quantité d'hyaluronidase

qui, dans 2 cm³ d'une solution de Ringer, disperse les cellules péri-ovulaires de 2 ovules sur 3 (ou de 50 % d'un plus grand nombre d'ovules, sans toutefois que ce chiffre puisse être supérieur à 8) en trois quarts d'heure, une heure. Les cellules sont considérées comme dispersées lorsqu'il n'en reste pas plus d'une couche autour de l'ovule. Cette unité est sensiblement égale à l'unité V. R. U.

Un problème reste à résoudre, sur lequel peu de chercheurs semblent s'être penchés : comment l'enzyme parvient-il au niveau de l'ovule ?

Certains auteurs ont vu dans les spermatozoïdes les véhicules de l'hyaluronidase [31]. Au fur et à mesure que ceux-ci avancent dans un milieu nouveau, ils perdent progressivement la diastase dont ils sont chargés, celle-ci passant en solution dans le milieu qui les entoure [73]. Le grand nombre de spermatozoïdes présents dans le sperme s'expliquerait alors par l'action de masse qu'ils doivent jouer au niveau de l'ovule autour duquel ils doivent créer une concentration en hyaluronidase suffisante pour que la dénudation puisse avoir lieu [66]. Cette idée d'action de masse est assez ancienne, puisque Loeb, en 1906, la soupçonnait déjà, sans toutefois pouvoir l'expliquer.

Cependant, Greeberg, Werthessen, Berman et Gargill démontrèrent expérimentalement [22] que le tractus génital normal de la lapine ne contient pas d'hyaluronidase, mais qu'il est possible d'en mettre en évidence dans l'utérus moins d'une minute après le coït. Il semble bien que dans de telles conditions les spermatozoïdes ne puissent être rendus responsables du transport de l'enzyme. Il faut supposer sa diffusion par imprégnation des tissus environnants, ce qui est possible, l'hyaluronidase faisant partie des facteurs de diffusion.

Quel que soit le mécanisme invoqué pour son transport, le rôle de la diastase dans les phénomènes de fécondation est indubitable. Si elle n'agit en aucune façon sur le mucus cervical, elle est par contre indispensable pour que la dénu-

dation de l'ovule puisse avoir lieu. Et ce phénomène est essentiel pour que la fécondation se produise, puisqu'il conditionne la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule. Sans hyaluronidase, il n'est pas de fécondation possible.

Aux très nombreuses causes de stérilité masculine, il conviendra donc désormais d'ajouter les stérilités par insuffisance ou manque d'hyaluronidase.

Lorsqu'elles ont été diagnostiquées avec certitude, ces stérilités sont justiciables d'un traitement assez simple. Il suffira d'ajouter au sperme l'enzyme déficient pour le voir récupérer tout son pouvoir fécondant. C'est ce traitement et les résultats obtenus jusqu'à ce jour que nous allons maintenant étudier.

TROISIEME PARTIE

HYALURONIDASE ET STÉRILITÉ

Etant donné le rôle primordial joué par l'hyaluronidase dans la fécondation, on ne peut plus dire, avec Huhner : « La constatation d'un sperme normal, contenant des spermatozoïdes, dans le cul-de-sac postérieur du vagin à la suite d'un coït normal démontre une spermatogénèse normale et un bon ensemencement. Par le fait même, elle absout le mâle de toute responsabilité en cause. »

Hinglais [25], à partir de statistiques basées sur quinze années d'observation, compare ses résultats avec ceux qu'ont obtenus des auteurs étrangers, et conclut qu'en moyenne un très bon sperme doit contenir au moins 100 millions de spermatozoïdes par centimètre cube. Jusqu'à 60 millions, la fertilité reste bonne; au-dessous de ce chiffre, elle diminue rapidement.

La relation existant entre la quantité de diastase présente dans le sperme et le nombre de spermatozoïdes nous a montré qu'en dessous de 50 millions de spermatozoïdes par centimètre cube la quantité d'enzyme présente est nulle ou très insuffisante, dans la grande majorité des cas, pour que la fécondation puisse avoir lieu. Un premier point est donc acquis : tout sperme infécondant présentant moins de 50 millions de spermatozoïdes par centimètre cube peut, presque à coup sûr, voir attribuer son manque de potentiel à une absence de diastase. En dehors de ce cas précis, aucun caractère morphologique du sperme ne permet de dire si l'hyaluronidase est présente en quantités suffisantes. Un dosage est nécessaire.

W. W. Williams, étudiant les causes possibles de la stérilité chez l'homme, a proposé de qualifier d'asthénospermie « la diminution du pouvoir de fécondation du sperme, en dépit de son aspect normal à tous points de vue » [77]. Ces asthénospermies étaient d'origine inconnue; Kurzrok, Léonard et Conrad [34] nous rapportent quelques cas qui rentrent dans cette catégorie de stérilité : des hommes réputés féconds (puisqu'utilisés comme donneurs de sperme pour hétéro-inséminations) se montrèrent brusquement stériles pour une raison indéterminée. Aucune modification apparente dans les caractères de leur sperme ne put être relevée : la concentration en spermatozoïdes variait entre 130 et 160 millions par centimètre cube. La motilité, la morphologie, la pénétration du mucus, en un mot tous les tests habituels, étaient des plus satisfaisants. On se trouvait donc en présence d'asthénospermie. Le dosage de l'hyaluronidase fut alors fait. Il fut impossible de mettre cet enzyme en évidence dans les échantillons analysés, et il suffit d'ajouter de l'hyaluronidase lors des inséminations qui furent faites par la suite pour voir ce sperme redevenir fécond.

Sans vouloir dire que toutes les asthénospermies sont dues à une absence d'hyaluronidase, il semble que beaucoup d'entre elles en relèvent. On pourrait les qualifier d'asthénospermies « diastasiques », pour les distinguer des autres, d'étiologie encore indéterminée, et que l'on pourrait nommer pour cette raison asthénospermies « essentielles » ou « cryptogénétiques ».

Deux catégories de stérilité sont donc causées par le manque d'hyaluronidase : l'oligospermie et l'asthénospermie diastasique. Elles ne pourront être reconnues avec certitude qu'après dosage de l'enzyme dans le sperme.

Ce dosage pourra être fait par différents procédés, sur lesquels nous ne reviendrons pas. Nous avons exposé leurs principes en général et nous avons donné en détail une méthode de dosage en étudiant le sperme et l'hyaluronidase.

D'après les résultats de Kurzrok, Léonard et Conrad, il

semble qu'une concentration minima de 0,38 H.U.S. par centimètre cube soit nécessaire pour que la fécondation puisse avoir lieu. Et si l'on applique l'équation de Swyer, on voit qu'un sperme ayant 60 millions de spermatozoïdes par centimètre cube contient 0,22 unités de Swyer et Emmens au centimètre cube, soit environ 12 V.R.U. de Mac Clean et Hale. Il semble que ce sont là les quantités moyennes d'enzyme que doit contenir un sperme pour avoir un pouvoir fécondant normal.

L'expérience qui est à la base du traitement des deux formes de stérilité que nous venons de préciser est due à Rowlands. Elle est la suivante [66] :

On provoque l'ovulation chez des lapines par injection intra-veineuse de 50 unités internationales de gonadotrophine choriale. D'autre part, on recueille le sperme de 8 à 12 lapins différents. On mélange les échantillons obtenus et on dilue l'ensemble dans une solution de Baker, de façon à obtenir une concentration en spermatozoïdes de 20 millions par centimètre cube. A partir de cette suspension mère, on fait des dilutions, de façon que la concentration en spermatozoïdes varie de 2 millions à 20.000 par centimètre cube. D'un autre côté, on prépare un filtrat de sperme contenant de l'enzyme (chauffage à 50° C pendant cinq minutes, puis centrifugation vigoureuse afin de supprimer tous les éléments figurés). On mélange alors en parties égales une dilution de spermatozoïdes et du filtrat de sperme. On prend 2 cm^3 de ce liquide qui sont utilisés pour inséminer les lapines environ sept heures après l'injection de gonadotrophine choriale (soit approximativement quatre heures avant l'ovulation). Les animaux sont sacrifiés trente-six heures après le moment présumé de l'ovulation, alors qu'un œuf normalement fécondé compte déjà de 8 à 16 blastomères. On lave les trompes pour recueillir les ovules. La vitesse de segmentation paraissant normale, on rejette comme non fécondés les ovules encore unicellulaires à ce stade de l'expérimentation.

Les résultats de l'expérience sont les suivants : toutes les lapines furent fécondées, sauf celle qui reçut l'échantillon le moins riche en spermatozoïdes (20.000 par centimètre cube). Or, normalement, une concentration minima de 200.000 est nécessaire pour assurer la fécondation.

Cette expérience prouve qu'un sperme considéré comme impropre à assurer la fécondation peut récupérer son pouvoir lorsqu'on lui ajoute de l'hyaluronidase : on expérimenta sur l'homme, et les résultats obtenus confirmèrent tous les espoirs.

Technique du traitement.

Elle nous est fournie par Kurzrok, Léonard et Conrad [34], qui préconisent les deux méthodes suivantes :

Addition directe de l'enzyme au sperme. — L'homme apporte, ou, mieux, ce qui est préférable mais pas toujours possible, on recueille au laboratoire même le sperme. Dans une cupule, on le mélange à l'hyaluronidase, et, avec une seringue, on « vaporise » le tout sur le col de l'utérus. Ce mélange ne doit jamais être injecté dans la cavité utérine. Pendant les vingt minutes qui suivent, la femme reste en Trendelenburg assez accusé.

Dépôt de l'enzyme au niveau du col. — Lorsque, pour une raison quelconque, il n'est pas possible d'avoir le sperme pour faire le mélange *in vitro*, on peut faire une application directe de l'hyaluronidase au niveau du col. Un peu d'ouate stérile est introduite dans le col et ramène, lorsqu'on la retire, une petite quantité de mucus. On trempe ce coton chargé de mucus dans l'enzyme et on replace le mucus dans le canal cervical. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à complète utilisation de l'enzyme. On demande à la femme d'avoir un rapport dans les quelques heures qui suivent cette application. Au cours de l'opération, il est très important, pour des raisons que nous allons étudier, de ne pas faire saigner le col.

Ces deux traitements sont répétés quatre fois les deux jours qui précèdent et les deux jours qui suivent la date présumée de l'ovulation.

Doses.

Les doses utilisées ne sont pas fixées d'une manière absolue. On ignore, en effet, si toute la quantité d'enzyme ou seulement une fraction arrive au niveau de l'ovule. On s'est livré à des considérations d'ordre purement théorique sur ce sujet. Léonard et Kurzrok ont montré, dans des travaux non publiés, qu'il fallait 33 γ de la préparation la plus pure d'enzyme pour dénuder l'ovule de rat *in vitro* dans des conditions standard.

Pratiquement, les quantités d'hyaluronidase utilisées par les différents expérimentateurs sont comprises entre 10 et 20 mg. Les résultats obtenus sont très satisfaisants. Il semble que des quantités inférieures à 10 mg. donnent des résultats beaucoup plus aléatoires.

Résultats obtenus.

Peu nombreuses sont encore les observations relatant le traitement de stérilités par l'hyaluronidase. Nous allons citer ici toutes celles dont nous avons eu connaissance, dans le but d'illustrer au maximum cette thérapeutique encore peu connue et qui a donné à ceux qui l'ont utilisée des résultats très encourageants.

1° ***Observations de Kurzrok, Léonard et Conrad*** (1946) [34].

Cas J. S. — La patiente, âgée de 26 ans, présente une stérilité primaire datant de quatre ans. Les règles sont régulières et l'examen physique général est négatif. Un examen gynécologique montre une hypoplasie cervicale.

Une insufflation faite le 27 septembre 1945 montre une imperméabilité tubaire à une pression de 180 mm. de Hg. On donne à la malade de la Trasentine. Le 2 octobre 1945, on renouvelle l'insufflation. La pression monte à 180 mm., puis redescend à 80 mm.

Le gaz passe. Un syndrome typique avec douleur dans l'épaule apparaît, prouvant la perméabilité tubaire.

Le 2 novembre 1945, une biopsie de l'endomètre révèle qu'il est en bonne phase sécrétoire. L'ovulation se produit au treizième jour (test de Papanicolaou et Shorr).

Le 22 août 1945, un examen du sperme avait donné les résultats suivants :

Sperme P 77 : âge, 2 heures; volume, 1 cm^3.
Viscosité : mucoïde.
Motilité : 30 à 40 % mobile. Quelques mouvements oscillatoires.
Morphologie : 70 à 75 % anormale.
Numération : 19 millions par centimètre cube.

Un autre examen, fait le 21 septembre 1946, donne :

Sperme P 99 : âge, 2 heures; volume, 2 cm^3.
Viscosité : mucoïde.
Motilité : 40 % mobile. Mouvements oscillatoires.
Morphologie : 70 à 75 % anormale. Débris granulaires et cellulaires.
Numération : 19 millions par centimètre cube.

La malade fut vue le 10 décembre 1945. Ces dernières règles dataient du 29 novembre 1945. Elle était seulement au douzième jour de son cycle. 10 mg. d'hyaluronidase furent déposés sur le col utérin, et on demanda à la malade d'avoir un rapport dans les heures qui suivraient.

Le test d'Ascheim-Zondek était positif le 10 janvier 1946.

Cas A. W. M. — La patiente est âgée de 31 ans. Stérilité secondaire datant de sept ans. Elle fut enceinte en 1938, fit une fausse couche, puis eut un enfant « mort et macéré ». Ses règles sont régulières. L'examen physique général est négatif. Un examen gynécologique montre une hypoplasie génitale modérée.

Le 26 octobre 1945, une insufflation tubaire est faite. Les trompes se révèlent closes à une pression de 180 mm. de Hg. On demande à la malade de prendre de la Trasentine.

Le 5 novembre 1945, une biopsie endométriale montre un endomètre qui sécrète bien. L'ovulation a lieu le quinzième jour du cycle. Le 13 décembre 1945, nouvelle insufflation tubaire. Les trompes sont perméables à une pression de 180 mm. de Hg. Douleur typique dans l'épaule. La malade continue à prendre de la Trasentine.

Le 5 février 1946, nouvelle insufflation tubaire. Les trompes sont perméables à une pression de 120 à 140 mm. de Hg. Douleur typique dans l'épaule.

La malade vient au laboratoire le 6 mars 1946. Ses dernières règles sont du 22 février 1946. Une application d'hyaluronidase est faite sur le col, et on fait une injection de 2.000 R. U. de Progynon B.

La malade revient le 26 mars 1946. Ses dernières règles sont du 21 mars. Une nouvelle application d'hyaluronidase est faite sur le col. On fait de plus une injection de 1.000 U. I. d'Anteron (gonadotrophine équine) afin de hâter la date de l'ovulation, la malade étant venue un peu tôt, ses dernières règles ne datant que de cinq jours. On lui demanda d'avoir un rapport dans les heures suivantes. La malade avait apporté un échantillon de sperme émis deux heures environ avant son arrivée au laboratoire. Le coït eut donc lieu le même jour, bien que l'on considère habituellement un second échantillon de sperme comme étant de moins bonne qualité que le premier.

Un examen du sperme qui avait été fait le 26 février 1945 avait donné les résultats suivants :

Sperme P 142 : âge, 2 heures; volume, 2 cm³.
Viscosité : normale.
Motilité : 5 %.
Morphologie : 65 à 70 % anormale. Nombreuses formes embryonnaires, spermatozoïdes, sans tête. Débris cellulaires.
Numération : 19 millions par centimètre cube.

Un autre examen de sperme fut fait le 27 mars 1946. Il montra :

Sperme P 324 : âge, 2 heures; volume, 1,5 cm³.
Viscosité : très visqueux.

Motilité : 60 % mobile.

Morphologie : 35 % anormale. Résidus cytoplasmiques, formes sans tête.

Numération : 128 millions par centimètre cube.

Le 4 mai 1946, le test d'Ascheim-Zondek était positif.

Par suite, la malade apporta un échantillon de sperme afin qu'un dosage de l'enzyme soit fait. Comme on le prévoyait, il fut impossible d'en mettre en évidence. Cet échantillon, apporté le 20 mai 1946, présentait les caractéristiques suivantes :

Sperme P 418 : âge, 3 heures; volume, 1 cm^3.

Viscosité : visqueux.

Motilité : 85 %.

Morphologie : 30 % anormale. Têtes difformes. Formes embryonnaires.

Numération : 75 millions par centimètre cube.

Hyaluronidase : absente.

Cas K. K. — Malade âgée de 29 ans. Stérilité secondaire datant de un an. Trois ans auparavant, grossesse normale, accouchement et suites de couches normaux. Règles normales. Rien à signaler en dehors d'un utérus en rétroflexion, mobile.

Le 20 mars 1945, une insufflation montre une bonne perméabilité tubaire.

Le 28 mars 1945, biopsie endométriale qui montre un endomètre en bonne phase sécrétoire. L'ovulation semble avoir lieu entre le onzième et le seizième jour, sans que l'on puisse préciser davantage, les frottis vaginaux ne donnant pas entière satisfaction.

Une insufflation est faite le 9 mai 1945. Les trompes sont perméables à une pression comprise entre 90 et 60 mm. de Hg. Douleur typique dans l'épaule.

Un examen du sperme est fait le 29 mars 1945. Il révèle :

Sperme : âge, 2 h. 1/2; volume, 2 cm^3.

Viscosité : normale.

Motilité : 75 % mobile.

Morphologie : 75 % anormale. Formes embryonnaires.

Numération : 20 millions par centimètre cube.

Un second examen est fait le 8 novembre 1945. Les résultats sont les suivants :

Sperme P 160 : âge, 2 heures; volume, 2,5 cm³.
Viscosité : normale.
Motilité : faible.
Morphologie : 75 % anormale.

Numération : 107 millions par centimètre cube.

Un troisième examen est fait le 4 février 1946. Il montre :

Sperme P 252 : âge : 2 h. 1/2; volume, 4 cm³.
Viscosité : normale.
Motilité : 0.
Morphologie : 65 % anormale. Formes embryonnaires.
Numération : 196 millions par centimètre cube.

Etant donné la faible motilité constante, un examen fut fait moins de deux heures après un coït. On trouva des spermatozoïdes mobiles dans le vagin et sur le col.

Le 16 mars 1946, la malade vient au laboratoire. Ses dernières règles sont du 6 mars. On fait une application d'hyaluronidase sur le col.

Le 29 avril, test d'Ascheim-Zondek positif.

Cas M. S. — Malade de 26 ans. Stérilité primaire datant de quatre ans. Par deux fois déjà, des examens complets ont été faits et se sont tous révélés négatifs. On les recommence pour vérification, mais on ne découvre rien de nouveau.

Le 12 février 1946, une insufflation tubaire montre une perméabilité des trompes à une pression de 70 mm. de Hg. Le 20 mars 1946, une biopsie endométriale montre un endomètre qui sécrète. Le 5 avril 1946, la malade vient au laboratoire. Ses dernières règles sont du 24 mars 1946. On lui fait une application d'hyaluronidase sur le col. Elle revient le 23 mai 1946, enceinte.

Un examen du sperme fut pratiqué le 12 avril et donna les résultats suivants :

Sperme P 261 : âge, —; volume, 3,5 cm³.
Viscosité : normale.

Motilité : 85 %.
Morphologie : 10 % anormale.
Numération : 392 millions.

Cas F. J. — Malade de 34 ans. Stérilité primaire datant de quatre ans. Règles régulières, mais migraines menstruelles. Bonne perméabilité tubaire. Examen physique négatif. La malade a pris 1/4 à 3/4 de gramme de thyroïde et des injections d'extraits hormonaux. Un examen gynécologique montre une légère hypoplasie et une rétroversion congénitale.

Un métabolisme basal est fait le 23 janvier 1946. Il se révèle abaissé de 11 %. On augmente les doses de thyroïde jusqu'à 1 g. par jour.

Le 23 janvier, un examen de sperme donne les résultats suivants :

Sperme P 200 : âge, 2 heures; volume, 2 cm³.
Viscosité : normale.
Motilité : 35 %.
Morphologie : 60 % anormale. Formes embryonnaires.
Numération : 112 millions par centimètre cube.

Le 7 février 1946, une biopsie endométriale révèle un endomètre qui sécrète. L'ovulation a lieu le quinzième jour du cycle.

La malade vient au laboratoire le 28 mars 1946. Ses dernières règles sont du 18 mars. On lui donne 1.000 U. I. d'Anteron (gonadotropine équine) et 500 U. I. de Follutein (gonadotrophine choriale pour hâter l'ovulation, puis on fait une application d'hyaluronidase sur le col. Le 25 avril 1946, la malade revient. Ses dernières règles sont du 15 avril. Elle reçoit 800 U. I. d'Anteron et 500 U. I. de Follutein. Nouvelle application d'hyaluronidase.

Le 27 mai, test d'Ascheim-Zondek positif.

Cas E. H. — Malade de 30 ans. Stérilité primaire datant de quatre ans. La malade a subi de nombreux examens. De nombreux tests ont été faits. Un examen gynécologique montre un col en antéflexion et une hypoplasie cervicale. Les trompes avaient été trouvées perméables, et l'examen n'est pas renouvelé.

Le 26 mars, une biopsie endométriale montre un endomètre sécrétant légèrement. L'ovulation a lieu le douzième jour du cycle. Les frottis montrent une phase œstrogène prolongée.

Un examen du sperme montre, le 15 mars 1946 :

Sperme P 305 : âge, 2 h. 1/2; volume, 2 cm³.
Viscosité : légère.
Motilité : 25 %.
Morphologie : 50 % anormale. Formes embryonnaires, anguleuses.
Numération : 67 millions par centimètre cube.

Le 6 avril 1946, un nouvel examen donne les résultats suivants :

Sperme P 336 : âge, 2 h. 1/2; volume, 3 cm³.
Viscosité : normale.
Motilité : 70 %.
Morphologie : 15 % anormale, têtes anguleuses.
Numération : 171 millions par centimètre cube.

La malade vient au laboratoire le 2 mai 1946. Ses dernières règles datent du 21 avril 1946. On fait une application d'hyaluronidase sur le col.

Le 3 juin 1948, le test d'Ascheim-Zondek est positif.

2° *Observations de Mme F. Moricard.*

En France, l'hyaluronidase est encore très peu employée. Seule, à notre connaissance, Mme F. Moricard s'est servie de cette diastase. Nous rapporterons ici ses trois observations [60].

Cas D... — Mariée depuis 1936, cette malade consulte en 1945 pour stérilité primaire. Le mari a été prisonnier de 1940 à 1945.

L'examen gynécologique, suivant la technique d'exploration de stérilité, montre que la muqueuse utérine est en état folliculo-lutéinique typique; l'insufflation est positive. Par contre, la recherche des spermatozoïdes dans la glaire cervicale montre qu'il y a

oligospermie et asthénospermie. Un examen direct montre quelques rares spermatozoïdes immobiles et des cellules de la lignée spermatique (spermatocytes et spermatides).

Le mari est traité par 500 U. I. environ d'hormone gonadotrope, 600 mg. de testostérone et 200 mg. de vitamine E. Au cours des examens de contrôle faits de mars à juin 1946, on constate une augmentation du nombre des spermatozoïdes, qui sont plus mobiles, mais il est probable que ces modifications de l'état spermatique sont liées à un meilleur état alimentaire. On met à plusieurs reprises, à un centimètre environ de l'orifice externe du col, un centimètre cube de liquide spermatique recueilli intravaginal ou directement sans obtenir de fécondation. En mai 1946, les spermatozoïdes, plus nombreux, comprennent environ 40 % de spermatozoïdes mobiles.

Le 23 juin 1946 (dernières règles le 13 juin), on pratique une fécondation artificielle suivant la méthode exposée ci-dessous :

Le sperme est émis dans une boîte de Petri stérile au domicile de la malade. Cette boîte est apportée par la malade à ma consultation (délai de transport une heure environ), l'examen spermatique montre d'assez nombreux spermatozoïdes, 50 % sont mobiles. On mélange, à 3 cm^3 environ de sperme, 10 mg. d'hyaluronidase (140 unités environ); il semble y avoir une accélération des mouvements spermatiques. On injecte dans l'orifice externe du col de façon très lente et sans pression 1 cm^3 environ de ce mélange, dont une partie reflue immédiatement dans le vagin. La malade est laissée environ vingt minutes en position gynécologique.

En septembre 1946, on constate l'existence d'une grossesse d'environ 3 mois, qui semble bien correspondre à la fécondation du 23 juin.

Cas X... — Chez une malade de 42 ans, stérile depuis sept ans, où l'on trouvait à l'examen un gros utérus, la biopsie endo-utérine a montré un état folliculo-lutéinique prémenstruel. Une fécondation pratiquée dans les mêmes conditions n'a rien donné. Il est apparu, quarante-huit heures après, un syndrome douloureux abdominal avec fièvre, qui a d'ailleurs cédé au traitement médical.

Cas Y... — Chez une autre malade de 35 ans, stérilité primaire; nous avons pratiqué une fécondation analogue, sans résultat, mais il s'agissait d'une femme assez mal réglée et dont les pontes ovulaires sont peu probables, ou vraisemblablement peu nombreuses.

*
* *

Ces observations sont dans l'ensemble assez démonstratives des résultats que l'on peut obtenir dans le traitement de certaines stérilités, à la condition toutefois que le diagnostic du genre de stérilité ait été posé avec certitude. Or, nous l'avons montré, ce diagnostic n'est certain que lorsqu'un dosage de l'enzyme a été fait, et lorsque toutes les autres causes de stérilité ont été écartées. Il ne faut pas espérer trouver en l'hyaluronidase une panacée universelle permettant de rendre féconds tous les sujets stériles. Le traitement par l'hyaluronidase a ses indications bien précises, auxquelles il faudra se tenir, sous peine d'enregistrer de nombreux échecs.

Nous devons d'ailleurs reconnaître que, même lorsque l'indication est indubitable, on n'enregistre pas nécessairement 100 % de succès. En effet, on s'est demandé si l'organisme féminin ne pouvait pas, dans certaines conditions, détruire ou annihiler l'enzyme apporté par le sperme en quantités suffisantes. On a pu voir *in vitro* que certaines substances inhibaient l'action de l'enzyme. C'est ainsi que **Léonard** et Kurzrok (observations non publiées) ont pu montrer que l'héparine empêchait l'enzyme d'agir sur les ovules de rat pour les dénuder. On a parlé d'anticorps qui rendraient l'hyaluronidase inopérante. On essaya expérimentalement d'immuniser des rats avec du sperme, puis on étudia *in vitro* la dénudation des follicules sous l'action de la diastase. On ne put faire aucune différence entre la dénudation des follicules de rats immunisés et non immunisés. On étudia alors l'action du sérum sanguin et il fut prouvé expérimentalement que ce sérum a une action certaine et rend inefficace l'hyaluronidase [37]. Cependant, lorsqu'on voulut utiliser cette pro-

priété du sérum *in vivo* comme moyen « anticonceptionnel » chez la lapine, l'échec fut total [38]. Toutes les lapines furent fécondées. Cependant, les résultats obtenus *in vitro* restent acquis, et c'est pour cette raison qu'il vaudra mieux éviter de faire des applications d'hyaluronidase sur un col qui saigne, lorsqu'on voudra traiter une stérilité.

Quelle que soit l'action inhibitrice d'un facteur ou d'un autre, les résultats obtenus permettent de penser qu'un grand nombre de stérilités restées jusqu'ici encore sans remède pourront être traitées avec succès. Et ce nombre se fera de plus en plus important au fur et à mesure que ce nouvel enzyme sera mieux connu.

Et si, en terminant, il nous est permis d'émettre un vœu, que ce soit celui de voir, dans un proche avenir, cette nouvelle ressource thérapeutique se répandre dans notre pays, où elle pourra contribuer à diminuer le nombre de foyers involontairement sans enfants.

CONCLUSIONS

A partir des facteurs de diffusion découverts par Duran-Reynals en 1928, une diastase a été découverte : l'hyaluronidase.

Cette diastase a pour propriété essentielle de dépolymériser un polysaccharide de poids moléculaire élevé et de haute viscosité : l'acide hyaluronique. Cet acide se trouve réparti chez l'homme dans différents organes. Il a pour origine le mésenchyme, et en conséquence ne se trouvera que dans les tissus dérivés de celui-ci.

L'hyaluronidase est une protéine thermolabile présentant tous les caractères des diastases.

La dépolymérisation de l'acide hyaluronique sous son action a pour résultat, après avoir diminué la viscosité de celui-ci, de libérer de l'acide glycuronique et de l'N-acétylglucosamine.

De nombreuses méthodes de dosage ont été proposées; elles ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients, mais on doit reconnaître qu'il n'existe actuellement encore aucune méthode suffisamment fidèle pour qu'on ait pu mettre au point une unité définitive pour cet enzyme.

Parmi tous les tissus dans lesquels on trouve de l'hyaluronidase, le plus riche est sans contredit le tissu testiculaire. L'hyaluronidase se retrouve aussi dans le sperme de la plupart des mammifères. Elle y serait associée aux spermatozoïdes. Ceux-ci n'en seraient que le véhicule, l'enzyme ayant pour origine l'épithélium germinal. Il existe une relation certaine entre le nombre de spermatozoïdes et la quantité d'hyaluronidase contenue dans le sperme. Cet enzyme semble donc lié au potentiel de fécondation du sperme.

Si l'on étudie les phénomènes de la fécondation en fonction de l'hyaluronidase, on voit qu'elle pourrait agir à deux moments précis :

— lors de la traversée du mucus cervical par les spermatozoïdes;

— lors de l'approche de l'ovule par ceux-ci.

En effet, étant donné la viscosité du mucus cervical et l'action de l'hyaluronidase sur des substances dites mucoïdes, on pouvait penser que la diastase, en diminuant la viscosité de ce milieu, rendrait plus facile pour ceux-ci la traversée du col. En dépit des recherches qui ont été faites jusqu'ici, cette hypothèse n'a pas encore reçu de confirmation expérimentale, et il est vraisemblable qu'elle ne pourra jamais être vérifiée, car pour plusieurs raisons le mucus cervical ne semble pas pouvoir contenir d'acide hyaluronique.

Par contre, lorsque l'ovule quitte l'ovaire, il est entouré de plusieurs couches de cellules provenant de la granulosa; ces cellules sont unies à l'ovule et entre elles par un gel essentiellement formé par de l'acide hyaluronique. L'hyaluronidase pourra donc agir à ce niveau et permettre la fécondation en dénudant l'ovule. Il a été prouvé expérimentalement qu'un sperme sans hyaluronidase a un pouvoir fécondant nul, tandis qu'un sperme, même pauvre en spermatozoïdes, peut avoir un pouvoir fécondant normal, à condition qu'il soit riche en hyaluronidase.

La découverte de cette diastase et de son action a permis de comprendre et de traiter certaines formes de stérilités restées jusque-là inexpliquées. Lorsque, par un dosage, l'absence de cette diastase dans un sperme est prouvée, on peut suppléer à cette déficience soit en ajoutant l'enzyme au sperme lui-même (et pratiquer avec ce mélange une auto-insémination), soit en déposant cet enzyme au niveau du col utérin avant un rapport sexuel. Les observations rapportées sur ce sujet montrent les succès encourageants obtenus par cette méthode.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et, s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit permis de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes, et, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

VU, BON A IMPRIMER :

Le Président,

M. RIVIÈRE.

VU : *Le Doyen,*

R. DUPÉRIÉ.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 25 mai 1948.

Pour le Recteur :

Le Vice-Président du Conseil de l'Université,

G. BRUS.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bacharrach (A. L.), Chance (M. R. A.) and Middleton (T. R.). — The biological essay of testicular diffusing factor. *Biochem. J.*, 34, 1463, 1940.
2. Bensley (S. H.). — On the presence, properties and distribution of the intercellular ground substance of loose connective tissues. *Anat. Record*, 60, 93, 1934.
3. Boyland (E.) and Mac Clean (D.). — A factor in malignant tissues which increases the permeability of the dermis. *J. Path. and Bact.*, 41, 353, 1935.
4. Chain (E.) et Duthie (E. S.). — A mucolytic enzyme in testis extracts. *Nature*, 144, 977, 1939.
5. — Identity of hyaluronidase and spreading factors. *Brit. J. Exptl. Path.*, 21, 324, 1940.
6. Chambers (R.) et Zweifach (B. W.). — Intercellular cement and capillary permeability. *Physiol. Reviews*, 27, 436, 1947.
7. Claude (A.). — Spreading properties of leech extracts and the formation of lymph. *J. Exptl. Med.*, 66, 353, 1937.
8. Claude (A.) tt Duran Reynals (F.). — On the existence of a factor increasing tissue permeability in organs other than testicle. *J. Exptl. Med.*, 60, 457, 1934.
9. — Chemical properties of the purified spreading factor grom testicle. *J. Exptl. Med.*, 65, 661, 1937.
10. Cunliffe (A. C.), Schwabacher (H.), Williams (O.) and Harper (G. J.). — Hyaluronidase production by staphylococci. *Brit. J. Exptl. Path.*, 26, 124, 1945.
11. Dubos (R. J.). — The autolytic system of pneumococci. *J. Exptl. Med.*, 65, 873, 1937.

12. Dubreuil (G.). — Les trompes de Fallope chez la femme. Vigot, édit., Paris, 1946.

13. Duran Reynals (F.). — Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. *C. R. Soc. biol.*, 99, 6, 1928.

14. — Studies of a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J. Exptl. Med.*, 58, 161, 1933.

15. — Les « facteurs de diffusion » et leur signification. *Annales de l'Institut Pasteur*, 57, 597, 1936.

16. — A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action. *J. Exptl. Med.*, 69, 69, 1939.

17. — Tissue permeability and the spreading factors in infections. A contribution to the host : parasite problem. *Bact. Rev.*, 6, 197, 1942 (Bibl.).

18. Duran Reynals (F.) and Stewart (F. W.). — The action of tumor extracts on the spread of experimental vaccinia of the rabbit. *Amer. J. Cancer*, 15, 2790, 1931.

19. Favilli (G.). — Ricerche sul mecanismo di diffusione di alcuni estratti d'organo nei tessuti. *Sperimentale, Arch. di Biol.*, 724, 1935.

20. — Mucolytic effect of natural and artificial spreading factors. Mucolytic effect of several diffusing agents and of a diazotized compound. *Nature*, 145, 866, 1940.

21. Fekete (E.) and Duran Reynals (F.). — Hyaluronidase in fertilization of mammalian ova. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. New York*, 52, 119, 1943.

22. Greenberg (B. E.), Werthessen (N. T.), Berman (S.) and Gargill (S. L.). — Transport of spermatozoa in female reproductive tract. *J. Urol.*, 54, 571, 1945.

23. Hahn (L.). — Ueber das mucolytische Enzyme des Saügerhodens. *Biochem. Ztschr.*, 315, 83, 1943.

24. — *Ark. f. Kemi. Mineral., o. Geol.*, 21 A, n° 1, 1945.

25. Hinglais (H.) et Hinglais (M.). — Contribution à l'étude et à l'appréciation de la valeur fécondante du sperme humain. *Sem. des hôp. Paris*, 23, 2490, 1947.

26. Hobby (G. L.), Dawson (M. H.), Meyer (K.) and Chaffee (E.). — The relationship between spreading factor and hyaluronidase. *J. Exptl. Med.*, 73, 109, 1941.

27. Hoffmann (D. C.) and Duran Reynals (F.). — The mecanism of enhancement of infections by testicle extracts. *Science*, 72, 508, 1930.

28. — The influence of testicle extract on the intradermal spread of injected fluids and particles. *J. Exptl. Med.*, 53, 387, 1931.

29. Humphrey (J. H.). — Hyaluronidase production by pneumococci. *J. Path. and Bact.*, 56, 273, 1944.

30. — Kinetics actions of hyaluronidase on hyaluronic acid preparations. *Biochem. J.*, 40, 435, 1946.

31. Joel (C. A.) and Eichenberger (E.). — Die Hyaluronidase, ein mucinspaltendes Ferment und deren Bedeutung für das menschliche Sperma. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 75, 601, 1945.

32. — Sperma und Hyaluronidase. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 75, 601, 1945.

33. Kass (E. H.) and Seastone (C. V.). — The role of the mucoïd polysaccharide (hualuronic acid) in the virulence of group A hemolytic streptococci. *J. Exptl. Med.*, 79, 319, 1944.

34. Kurzrok (R.), Leonard (S.) and Conrad (H.). — Role of hyaluronidase in human infertility. *Am. J. Med.*, 1, 491, 1946 (Bibl.).

35. Kurzrok (R.) et Miller (E. G. Jr.). — Biochemical studies of human semen and its relation to mucus of the cervix uteri. *Am. J. Obst. and Gyn.*, 15, 56, 1928.

36. Lamar (J. K.), Shettles (L. B.) et Delfs (El.). — Cyclic penetrability of human cervical mucus to spermotozoa *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, 129, 234, 1940.

37. Leonard (S. L.) and Kurzrok (R.). — A study of hyaluronidase-effect on the follicle cells of ovulated rat ova. *Endocrinology*, 37, 171, 1945.

38. — Inhibitors of hyaluronidase in blood sera and their effect on follicle cell dispersal. *Endocrinology*, 39, 85, 1946.

39. Leonard (S. L.), Perlmann (P. L.) and Kurzrok (R).. — A turbidimetric methode for determining hyaluronidase in semen and tissue extracts. *Endocrinology*, 39, 261, 1946.

40. — The effect of the prostate and seminal vesicle on the production of hyaluronidase by rat testes homogenate. *Endocrinology*. 40, 199, 1947.

41. Lythgoe (B.) and Madinaveitia (J.). — Studies on diffusing factors. 10-Note on the formation of viscous material by Clostridium butylicum. *Biochem. J.*, 37, 6, 1943.

42. Mac Clean (D.). — The influence of testicular extract and its effects upon tissue permeability. *J. Path. and Bact.*, 34, 459, 1931.

43. — Futher observations on testicular extract and its effects upon tissue permeability. *J. Path. and Bact.*, 34, 459, 1931.

44. — A factor in culturefiltrates of certain pathogenic bacteria which increases the permeability of the tissues. *J. Path. and Bact.*, 42, 477, 1936.

49. Mac Clean (D.) and Rowlands (I. W.). — Role of hyaluronidase. *J. Path. and Bact.*, 54, 284, 1942.

46. — Studies on diffusing factor. 2- Method of assay of hyaluronidase and their correlation with skin diffusing activity. *Biochem. J.*, 37, 169, 1943.

47. Mac Clean and Hale (C. V.). — Mucinase and tissue permeability. *Nature*, 145, 867, 1940.

48. — Studies on diffusing factors. The hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other avents that increase tissue permeability. *Biochem. J.*, 35, 159, 1941.

49. Mac Clean (D.) and Rowlands (I. W.). — Role of hyaluronidase in fertilization. *Nature*, 150, 627, 1942.

50. Madinaveitia (J.) and Quibbel (T. H. H.). — Studies on diffusing factors : the action of testicular extracts on the viscosity of vitreous humour preparations. *Biochem. J.*, 34, 625, 1940.

51. Mann (T.) and Lutwak-Mann (C.). — Non-oxydative enzymes. *Ann. Rev. Biochem.*, 13, 25, 1944.

52. Meyer (K.). — The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, 6, 91, 1938.

53. — Mucolytic enzymes. *Currents in biochemical research.* New York, Interscience Publ. inc., 1946, p. 18.

54. — The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.*, 27, 335, 1947 (Bibl.).

55. Meyer (K.), Chaffee (E.), Hobby (G. L.) and Dawson (M. H.). — Hyaluronidases of bacterial and animal origins. *J. Exptl. Med.*, 73, 309, 1941.

56. Meyer (K.), Dubos (R.) and Smyth (E. M.). — Action of the lytic principle of Pneumococcus on certain tissue polysaccharids. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 34, 816, 1936.

57. Meyer (K.) and Palmer (J. W.). — The polysaccharid of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.*, 107, 629, 1934.

58. — On the nature of ocular fluids. *Am. J. Ophtalm.*, 19, 859, 1936.

59. Morgan (W. T. G.). — Acid hyaluronic and hyaluronidase. *Annu. Rep. Prog. Chem. G. B.* 42, 236, 1945 (Bibl.).

60. Moricard (F.). — Fécondation artificielle réussie après adjonction d'hyaluronidase. Problème chimique des glucides de la sécrétion cervicale. *Gynécol. et Obstét.*, 45, 781, 1946.

61. Moricard (R.) et Gothie (S.). — Dissociation des cellules de la granulosa et problème d'un mécanisme diastasique dans la rupture du follicule ovarien de lapine. *C. R. Soc. de biol.*, 140, 249, 1946.

62. Novak (E.). — Gynecological and obstetrical pathology. W. B. Saundres Company. Philadelphie et Londres, 1947.

63. Perlman (P. L.), Leonard (S. L.) and Kurzrok (R.). — Some factors influencing the liberation of hyaluronidase from testes homogenate and spermotozoa in the rat. *Endocrinology*, 42, 26, 1948.

64. Pincus (G.) and Enzmann (E. V.). — The comparative behabiour or mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. II. — The activation of the tubal eggs of the rabbit. *J. Exptl. Zool.*, 73, 195, 1936.

65. Pommerenke (W. T.) and Rochester. — Cyclic changes in physical and chemical properties of the cervical mucus. *Am. J. Obst. and Gyn.*, 52, 1023, 1946.

66. Rowlands (I. W.). — Capacity of hyaluronidase to increase the fertilizing power of sperm. *Nature*, 154, 332, 1944.

67. Seastone (C. V.). — The virulence of group C. hemolytic streptococci of animal origin. *J. Exptl. Med.*, 70, 361, 1939.

68. — Occurrence of mucoid polysaccharides in hemolytic streptococci of human origin. *J. Exptl. Med.*, 77, 21, 1943.

69. Seguy (J.) et Vimeux (J.). — Etude de l'ascension des spermatozoïdes dans les voies basses de la femme. *Gynécol. et obstét.*, 27, 346, 1933

70. Sherber (Daniel A.), Birnberg (Charles H.) and Kurzrok (R.). — Viscosimetric determination of the hyaluronidase content of spermatozoa. *Endocrinology*, 42, 20, 1948.

71. Stewart (F. W.) et Duran Reynals (F.). — A study of the generalisation of vaccine virus from enhanced skin lesions. *J. Exptl. Med.*, 50, 341, 1929.

72. Swyer (G. I. M.). — The hyaluronidase content of semen. *Biochem. J.*, 41, 409, 1947.

73. — The release of hyaluronidase from spermatozoa. *Biochem. J.*, 41, 413, 1947.

74. Swyer (G. I. M.) and Emmens. — A modified method for the viscosimetric assay of hyaluronidase. *Biochem. J.*, 41, 29, 1947.

75. Viergiver (E.) and Pommerenke (W. T.). — Cyclic variations in viscosity of cervical mucus, Correlation with amount of secretion and basal temperature. *Am. Jour. Obst. and Gyn.*, 51, 192, 1946.

76. Werthessen (N. T.), Berman (S.), Greenberg (B. E.) and Gargill (S. L.). — Technique for the assays of hyaluronidase in human semen and its correlation with sperm concentration. *J. Urol.*, 54, 565, 1945.

77. Williams (W. W.). — Male sterility. *New England J. Med.*, 227, 905, 1942.

78. Anon. — The hyaluronidase-Hyaluronic acid system. *J.A.M.A.*, 129, 365, 1945.

79. — Hyaluronidase. A monograph from the Clinical Research Division. Schering Corporation. *Bloomfield N. J.*, 1947 (Bibl.).

Dépôt légal effectué en 1954 (1er trimestre).

26739. — Imprimeries Delmas, Bordeaux.